DIE BEDEUTUNG VERSCHIEDENER METHODISCHER UND PHYSIOLOGISCHER FAKTOREN FÜR DIE HÖHE DER IONISIERTEN CALCIUMFRAKTION IN BLUT UND LIQUOR

Klaus Kölling

Diss. München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0003

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. G. ten Bruggencate
Prof. Dr. med. E. Gerlach
Prof. Dr. med. K. Thurau

DIE BEDEUTUNG VERSCHIEDENER METHODISCHER UND PHYSIOLOGISCHER FAKTOREN FÜR DIE HÖHE DER IONISIERTEN CALCIUMFRAKTION IN BLUT UND LIQUOR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. vet. Klaus Kölling
aus
Wüstermarke N/L

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Horn
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27.11.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2.	LITERATUR	4
2.1.	METHODEN	4
2.1.1.	Bestimmung des Gesamtcalciums	4
2.1.2.	Bestimmung des ultrafiltrierbaren, protein- und komplexgebundenen Calciums	6
2.1.3.	Bestimmung des ionisierten Calciums	7
2.1.3.1.	Ionenselektive Elektroden	8
2.1.3.1.1.	Meßprinzip der ionenselektiven Elektroden	11
2.1.3.1.2.	Anwendungscharakteristika der ionenselektiven Elektroden	14
2.1.3.2.	Berechnung	14
2.2.	CALCIUMFRAKTIONEN IM BLUT	17
2.2.1.	Interaktionen	17
2.2.2.	Physiologische Funktionen	20
2.3.	EINFLUSS PRÄANALYTISCHER FAKTOREN AUF DIE AUSSAGEFÄHIGKEIT DER ERMITTELTEN WERTE FÜR GESAMTCALCIUM UND IONISIERTES CALCIUM IM BLUT	22
2.3.1.	Abhängigkeit von verschiedenen physiologischen Faktoren	23
2.3.1.1.	Geschlecht und Alter	23
2.3.1.2.	Schwangerschaft und Geburt	25
2.3.1.3.	Rhythmik	25
2.3.1.4.	Ernährungsstatus	27
2.3.1.5.	Körperlage	28
2.3.1.6.	Körperliche Belastung	29
2.3.1.7.	Komplexbildende Substanzen	31
2.3.1.8.	Säure-Basen-Status	32

		Seite
2.3.2.	Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen der Probengewinnung	34
2.3.2.1.	Entnahmeort	34
2.3.2.2.	Blutentnahme - Stauung	35
2.3.2.3.	Blutentnahme - anaerob	36
2.3.2.4.	Blutentnahme - Antikoagulation	39
2.3.3.	Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen der Probenbehandlung	40
2.3.3.1.	Transport und Lagerung	40
2.4.	EINFLUSS ANALYTISCHER FAKTOREN AUF DIE AUSSAGEFÄHIGKEIT DER ERMITTELTEN WERTE FÜR DAS IONISIERTE CALCIUM IM BLUT	42
2.4.1.	Temperaturabhängigkeit der Messung	42
2.4.2.	Interferenzen seitens verschiedener Störionen	43
2.4.3.	Interferenzen seitens der Osmolarität	45
2.4.4.	Interferenzen seitens der Plasmaproteine	45
2.4.5.	Interferenzen seitens der Erythrozyten	46
2.4.6.	Interferenzen seitens Trypsin und Triäthanolamin	46
2.4.7.	Interferenzen seitens der Fließgeschwindigkeit	47
2.5.	CALCIUMFRAKTIONEN IM LIQUOR CEREBROSPINALIS	47
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	50
3.1.	METHODEN	50
3.1.1.	Arten der Probengewinnung und Probenbehandlung	50
3.1.1.1.	Standardisierte Blutentnahme	50
3.1.1.2.	Blutentnahme zur Überprüfung der Zuverlässigkeit	50

		Seite
3.1.1.3.	Blutentnahme bei Stauung mit und ohne Bewegung der gestauten Extremität	51
3.1.1.4.	Blutentnahme vor und nach Hyperventilation	51
3.1.1.5.	Blutentnahme zur Untersuchung des Heparineffektes	51
3.1.1.6.	Transport und Lagerung der Blutproben	52
3.1.1.7.	Anaerobe Plasmagewinnung	52
3.1.1.8.	Anaerobe Serumgewinnung	52
3.1.1.9.	Tonometrie	53
3.1.2.	Lumbalflüssigkeitsentnahme	53
3.1.3.	Normwertbestimmungen	54
3.1.4.	Arten der Probenanalyse	54
3.1.4.1.	Bestimmung des Säure-Basen-Status	54
3.1.4.2.	Bestimmung des Gesamtcalciums	55
3.1.4.3.	Bestimmung des ionisierten Calciums	57
3.1.5.	Arten der statistischen Auswertung der Resultate	59
3.2.	ERGEBNISSE	60
3.2.1.	Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von dem eingesetzten Analyzer mit ionenselektiven Elektroden	60
3.2.2.	Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von verschiedenen präanalytischen Faktoren	68
3.2.2.1.	Einfluß der Antikoagulation der Proben mit verschiedenen Heparinkonzentrationen	68
3.2.2.2.	Einfluß der Probenlagerung unter verschiedenen Temperaturbedingungen	70
3.2.2.3.	Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Venostase	75

Seite

3.2.3. Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von verschiedenen physiologischen Faktoren 78

3.2.3.1. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in den verschiedenen Regionen des Kreislaufes 78

3.2.3.2. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration unter "in vitro"-Bedingungen 80

3.2.3.3. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration unter "in vivo"-Bedingungen 82

3.2.3.4. Konzentration des Gesamtcalciums im Serum (Normalwertbereich) 85

3.2.3.5. Konzentration des ionisierten Calciums im Serum (Normalwertbereich) 85

3.2.3.6. Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut (Normalwertbereich) 88

3.2.4. Konzentration des ionisierten Calciums im Liquor cerebrospinalis 93

4. DISKUSSION 95

5. ZUSAMMENFASSUNG 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 112

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Calcium ist ein wesentliches Element des Organismus und essentieller Bestandteil unserer Nahrung. Es ist in viele physiologische und biochemische Prozesse involviert. Calcium spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Entwicklung der Zellen und beeinflußt entscheidend die Durchlässigkeit (Permeabilität) der Zellmembranen, die Blutgerinnung, die neuromuskuläre Erregungsübertragung, die Muskelkontraktion, die Sol-Gel-Umwandlung sowie eine Reihe von Enzym- und Hormonreaktionen.

In höheren als den normalen physiologischen Konzentrationen wirkt Calcium toxisch auf eine Reihe von Enzymsystemen. So ist eine enge Regulation und Feineinstellung des Calciumspiegels in den Körperflüssigkeiten eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen.

An der Einstellung und Aufrechterhaltung des Calcium-Austausches in und aus dem Plasma ist eine Reihe von Hormonen, vor allem das Parathormon, das Calcitonin und die aktiven Metaboliten des Vitamin D beteiligt. Die wichtigsten Zielorgane für die Calciumregulation sind dabei Darm, Knochen und Niere.

Rund 99 % des gesamten Calciums im Organismus sind im Skelett gespeichert. Der Rest von ca. 1 % verteilt sich auf die anderen Körperzellen, das Interstitium und das Blut.
Bereits 1878 wurde durch die Untersuchungen von RINGER und MURRELL am Froschherzen bekannt, daß nicht das gesamte Calcium im Serum in freier Form vorliegt, sondern ein Teil gebunden ist. Als Ergebnis weiterer Untersuchungen (RONA und TAKAHASHI 1911) wurde schließlich das Gesamt-Calcium des Serums in eine ultrafiltrable, diffusible Fraktion und in eine proteingebundene, nicht diffusible Fraktion unterteilt. 1926 gliederte GREENWALD die diffusible Fraktion des

Calciums weiter auf in ein komplexgebundenes und in freies, ionisiertes Calcium.

1) **Proteingebundenes, nicht diffusibles Calcium:**

Die Calcium-Bindung an Proteinen erfolgt überwiegend am Albumin. PEDERSEN (1972 a,b,c) wies nach, daß die Bindung des Calciums an Albumin an den Carboxyl- und Imidazolgruppen kompetitiv mit Wasserstoffionen erfolgt.

2) **Komplexgebundenes, diffusibles Calcium:**

Neben dem für den Knochenstoffwechel wichtigen Calcium-Citrat kommen noch andere anorganische und organische Calcium-Komplexe im Serum vor, wie etwa Sulfate, Phosphate und Bicarbonat (NEUMAN et al. 1956).

3) **Freies, ionisiertes, diffusibles Calcium:**

Das ionisierte Calcium, die allgemein als physiologisch aktive Form angesehene Fraktion des Calciums in den Körperflüssigkeiten, wurde erstmals von McLEAN und HASTINGS im Jahre 1934 am Modell des schlagenden Froschherzens klinisch untersucht. Dieses Modell war ebenso wie andere "Bioassays" für den praktischen Einsatz unbrauchbar.

Mit der Einführung der ionenselektiven Elektroden Anfang der 60iger Jahre wurde das Interesse an der Messung des ionisierten Calciums erneut geweckt. Es folgten zahlreiche Untersuchungen zu den einzelnen Fraktionen des Calciums mit teilweise recht unterschiedlichen Ergebnissen. Die Aussagen hinsichtlich der klinischen Relevanz der Bestimmung der verschiedenen Calciumfraktionen divergieren stark. Ein Teil der widersprüchlichen Aussagen ist sicherlich auf das unterschiedliche methodische Vorgehen zurückzuführen.

So stellten sich die Aufgaben:

- die wesentlichsten in der Literatur aufgeführten Methoden zur Bestimmung der verschiedenen Calciumfraktionen zu erfassen und kritisch zu betrachten,

- die Beziehungen zwischen den Calciumfraktionen und die physiologischen Funktionen der verschiedenen Calciumfraktionen zu erörtern,
- sowie die Abhängigkeit der Bestimmung des Calciums, besonders des ionisierten Anteils, im Blut von verschiedenen physiologischen und methodischen Faktoren aus den Literaturangaben zu erfassen.

Nach einer ausführlichen und kritischen Betrachtung der Literaturangaben zu den oben genannten Punkten sollte experimentell versucht werden:

- die verschiedenen heute eingesetzten Meßsysteme zur Analyse des ionisierten Calciums zu vergleichen,
- die Abhängigkeit der auch mit ionenselektiven Elektroden neuerer Generation erhaltenen Meßwerte im Vollblut von verschiedenen methodischen und physiologischen Faktoren aufzuzeigen und
- Normwertbereiche für das ionisierte Calcium im Blut und im Liquor cerebrospinalis zu erstellen.

2. LITERATUR

2.1. METHODEN

2.1.1. Bestimmung des Gesamtcalciums

Die Bestimmung des Calciums im Plasma oder Serum als Gesamtcalcium kann auf verschiedene Weise erfolgen. Die eingesetzten Methoden basieren dabei entweder auf den chemischen Eigenschaften des Calciums, lösliche und unlösliche Komplexe zu bilden oder auf vorwiegend physikalischen Eigenschaften des Calciums.

Zu den chemischen Methoden gehören die Oxidimetrie (35, 124), die EGTA- bzw. EDTA-Titration (38, 48, 60, 65, 290), die Fluorometrie (80, 111, 135, 169, 174) und die Kolorimetrie (3, 8, 85, 112, 119, 205, 292). Die Nachteile dieser chemischen Methoden liegen besonders in ihrer nicht immer ausreichenden Spezifität und den dadurch häufig auftretenden Interferenzen anderer Ionen. Darüber hinaus sind ein großes Probenvolumen, Zeitaufwand und zahlreiche Aufarbeitungsfehler als limitierende Faktoren zu nennen.

Zu den physikalischen Methoden gehören die Methoden der Polarographie (17), der Potentiometrie (6), der Neutronenaktivierungsanalyse (18, 25, 246), der Flammenemissionsphotometrie (44, 92, 150, 206, 225, 283) und der Atomabsorption (187, 188, 293, 303).

Für die Bestimmung des Gesamtcalciums im Serum ist die Methode der Atomabsorptions-Spektralphotometrie den meisten sonst allgemein benutzten Analyseverfahren überlegen (187); sie ist nicht nur einfach und schnell durchzuführen, sondern auch hochempfindlich und spezifisch (188, 293, 303).

Die verdünnte Serumprobe wird in die Flamme des AAS-Gerätes zerstäubt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels dissozieren die meisten Moleküle zu atomarem Dampf. Einige dieser Atome nehmen weiterhin Energie aus der Flamme auf und werden zu angeregten Atomen. Bei der Atomabsorption werden im

Gegensatz zur Flammenemissionsphotometrie die nicht angeregten Atome in der Flamme zur Messung benutzt. Ihre Konzentration in der Flamme ist um einige Zehnerpotenzen höher als die der angeregten Atome. Dies ist auch ein Grund, daß die Atomabsorption eine größere Empfindlichkeit aufweist. Die nicht angeregten Atome sind in der Lage, selektiv Licht spezifischer Wellenlänge (Resonanzlinien), welches aus einer Hohlkathoden-Spektrallampe durch die Flamme geschickt wird, konzentrationsabhängig zu absorbieren.

Nach PLANCK (189 a,b) kann infolge des quantenhaften Energieübergangs bei Absorption und Emission ein Atom nur Licht (Photonen) diskreter Wellenlänge (Frequenz) absorbieren oder emittieren gemäß dem Gesetz:

$$\epsilon = h \cdot \upsilon = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

h = Planck'sches Wirkungsquantum, υ = Frequenz, c = Lichtgeschwindigkeit, λ = Wellenlänge, ϵ und υ sind dabei für jede Atomart spezifisch.

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz ist auch bei dieser Methode die Extinktion E = 2 - log (100 Absorption) der Konzentration und der Schichtdicke des absorbierenden Mediums (Flammenlänge) direkt proportional.

Nach Erstellung einer Eichkurve mit bekannten Standards kann mit der Extinktion die Konzentration der untersuchten Probe bestimmt werden. Ein Strontiumchlorid- oder Lanthanchloridzusatz zur Probe ist notwendig, um bestimmte chemische Interferenzen mit Anionen zu verhindern. Sulfate und Phosphate bilden mit Calcium thermostabile Verbindungen und können dadurch einen Teil des Calciums dem Atomabsorptionsprozeß entziehen. Strontium und Lanthan haben eine größere Affinität zu Sulfaten und Phosphaten und verdrängen daher Calcium aus diesen Bindungen, womit das Calcium vollständig nachweisbar wird. Es wird aus diesem Grunde zur Probenverdünnung eine 0,25%ige Strontiumchloridlösung mit 6 % Butanol verwendet. Weitere Schritte zur Probenvorberei-

tung, insbesondere eine Enteiweißung, sind nicht erforderlich (187).

Proteine, Heparin, harnpflichtige Substanzen und Diuretika haben keinen Einfluß auf die Meßwerte der Calciumbestimmung mittels AAS (184, 185).

2.1.2. Bestimmung des ultrafiltrierbaren, protein- und komplexgebundenen Calciums

Die Bestimmung des proteingebundenen Calciums geschieht indirekt über eine Analyse der ultrafiltrierten Fraktion (nichtproteingebunden, diffusibel). Die Differenz zwischen Gesamt- und ultrafiltrierbarem Anteil des Calciums ergibt den proteingebundenen Anteil.

$$Ca_{Prot.} = Ca_{Ges.} - Ca_{ultrafiltr.}$$

Die Bestimmung des ultrafiltrierbaren Calciums erfolgt mit den Verfahren der Dialyse (142, 231, 232), der Chromatographie (22, 100, 173, 195, 215), der Ultrazentrifugation (20, 144), der Ultrafiltration (41, 44, 62, 185, 233, 278, 279, 298) und der mathematischen Berechnung (302).

Von den Methoden zur Bestimmung des ultrafiltrierbaren, protein- und komplexgebundenen Calciums ist das Dialyseverfahren am einfachsten durchzuführen. Es werden jedoch große Probenvolumina benötigt, und die Dialysezeit ist mit 24 Stunden sehr lang. Es kann nicht anaerob gearbeitet werden, und es ergeben sich starke pH-Verschiebungen. Auch bei der Chromatographie kommt es zu erheblichen pH-Veränderungen aufgrund der aeroben Bedingungen; dadurch wird die Calcium-Bindung stark beeinflußt. Nicht das gesamte diffusible Calcium, sondern nur ein Teil - in erster Linie das ionisierte - wird an die aktive Phase der Säule gebunden. Dadurch werden natürlich die Werte für das ultrafiltrierbare Calcium verfälscht.

Bei der Ultrazentrifugation und bei der Ultrafiltration - die am weitesten angewandte Methode zur Bestimmung des ultrafiltrierbaren Calciums -, reichen bereits geringe Probenvolumina zur Analyse aus, und es läßt sich anaerob arbeiten. Dieser Vorteil muß jedoch durch einen relativ großen apparativen Aufwand erkauft werden. Auch die Analysezeit ist nicht gering. PASCHEN (1975) entwickelte eine sehr brauchbare, mit geringer Fehlerquote ausgestattete Ultrafiltrationsmethode. Das von ZEISLER (1954) vorgeschlagene mathematische Verfahren zur Bestimmung des proteingebundenen bzw. ultrafiltrierbaren Calciums wurde wegen seiner großen Ungenauigkeit kaum eingesetzt.

2.1.3. Bestimmung des ionisierten Calciums

Seit der Erkenntnis, daß das Calcium im Blut in verschiedenen Fraktionen vorliegt und daß der ionisierte Anteil die wohl physiologisch wirksame und wichtigste Calcium-Fraktion des Organismus ist, begannen die Bemühungen zur Erarbeitung einer relevanten Analysentechnik.

Bisher wurden zur Messung des ionisierten Calciums in biologischen Flüssigkeiten verschiedene Verfahren eingesetzt. Man unterscheidet dabei biologische Bestimmungsmethoden (Bioassay) (36, 90, 120, 158, 159, 160, 189, 226, 227, 228, 264, 301), chemische (33, 59, 99, 147, 158, 194, 195, 205, 217, 218, 234), physikochemische und mathematische Verfahren.

Eine einleuchtende Voraussetzung für die Messung des ionisierten Calciums ist die Wahrung des Gleichgewichtes in allen Stufen der Analyse. Es wurde deutlich, daß an die Probenbehandlung und Meßtechnik bestimmte Anforderungen gestellt werden müssen, da die Gleichgewichtskonstante für den Calciumligand (285) und die Calcium-Protein-Wechselwirkung (197) relativ niedrig und von pH und Temperatur abhängig sind.

Die biologischen Verfahren zum Nachweis des ionisierten Cal-

ciums sind mit zahlreichen Fehlern behaftet. Trotzdem sind mit ihnen grundlegende Untersuchungen des Calcium-Stoffwechsels durchgeführt worden. Unter anderem wurde damit das von McLEAN und HASTINGS (1935) aufgestellte und später vielzitierte Nomogramm erstellt. Mit Hilfe dieses Nomogramms läßt sich aus den bekannten Konzentrationen von Gesamteiweiß und Gesamtcalcium die Konzentration des ionisierten Calciums bestimmen. Die Nachteile der biologischen Verfahren sind vor allem die Ungenauigkeit, der große zeitliche Aufwand, die geringe Empfindlichkeit sowie eine fehlende Spezifität bei Interferenzen durch zahlreiche andere Ionen. Eine Bestimmung unter anaeroben Bedingungen, eine für die exakte Bestimmung zur Wahrung des pH-Wertes wesentliche Voraussetzung, ist ebenfalls nicht gegeben.

Die Nachteile der chemischen Methoden sind vor allem die relativ großen Probenvolumen, der teilweise komplizierte, mit vielen Fehlern behaftete Aufbereitungsvorgang, eine unzureichende Spezifität und Empfindlichkeit besonders bei hohen Calciumionenkonzentrationen. Durch den Einsatz von Tetramethylmurexid anstelle von Murexid als Farbreagenz konnte die pH-Abhängigkeit und die Bindung an Serumproteinen vermindert werden. Gegenüber den ersten Untersuchungen des ionisierten Calciums mittels Bioassay von McLEAN und HASTINGS, die für die Klinik nicht anwendbar waren, stellte der Einsatz von Calcium-sensitiven Farbstoffen als chemische Nachweismethoden einen gewissen Progreß dar (40, 61, 71, 123, 141, 287, 294).

Die wichtigste physiko-chemische Methode zur Bestimmung des ionisierten Calciums in verschiedenen biologischen Medien ist die ionenselektive Elektrode.

2.1.3.1. Ionenselektive Elektroden

Ionenselektive Elektroden sind elektrochemische Meßzellen, mit deren Hilfe sich Ionen-Aktivitäten oder Ionen-Konzentrationen in Elektrolytlösungen bestimmen lassen.

Die Grundlagen für dieses Meßverfahren wurden bereits von NERNST (1888, 1889) und PLANCK (1890 a,b) durch Untersuchungen zur Kinetik von Elektrolytlösungen und zur Theorie des Diffusionspotentials geschaffen. OSTWALD (1890) führte den Begriff der semipermeablen Membran ein und CREMER (1906) beschrieb als erster systematisch H^+-abhängige Phasengrenzflächenpotentiale an Glasmembranen. Ein Konzept für Flüssigionenaustauscher-Elektroden wurde vorgelegt. Die ersten Alkali-ionensensitiven Elektroden wurden durch LENGYEL und BLUM (1934) entwickelt. Durch EISENMAN et al. (1957) wurde die Ansprechbarkeit der Elektrodenglasmembran auf die Alkali-Ionen soweit verbessert, daß diese Elektroden im Routinebetrieb eingesetzt werden konnten. Gleichzeitig begann die Suche nach neuen, selektiven Membransystemen. Homogene und heterogene Festkörpermembranen sowie Flüssigionenaustauscher-Membranen wurden entwickelt (57, 235).

Teilt man die eingesetzten ionenselektiven Elektroden nach ihrer Membranstruktur und ihren Membranvorgängen ein, so weisen sie erhebliche Unterschiede auf.

Es sind dabei zu unterscheiden:

1. Glasmembranelektroden
2. Kristallmembranelektroden
3. Festkörpermembranelektroden (homogene und heterogene)
4. Flüssigmembranelektroden
5. Drahtüberzugelektroden
6. Enzymmembranelektroden
7. Gassensitive Elektroden

(4, 29, 30, 54, 56, 74, 75, 78, 122, 161, 162, 167, 216, 235, 236, 247).

Heute können bereits zahlreiche Elemente des Periodensystems mittels ionenselektiver Elektroden bestimmt werden. Nicht alle Systeme eignen sich jedoch für die potentiometrischen Ionenbestimmungen in biologischen Flüssigkeiten. Matrixeffekte der Probe, wie z.B. Protein- oder Störioneninterferenzen, können auftreten (76).

So sind die Anforderungen an eine ideale Analysenmethode zur Elektrolytbestimmung in Proben unterschiedlicher Art wie Vollblut, Plasma, Serum, Urin, Liquor, Fruchtwasser, Dialyselösungen und anderen biologischen Flüssigkeiten unter den verschiedensten Bedingungen vor allem:

1. eine hohe Spezifität
2. eine hohe Präzision
3. eine hohe Richtigkeit
4. ein minimales Probenvolumen
5. eine einfache Handhabung und
6. eine schnelle Durchführung.

PRÄZISION: Als Ausdruck der Übereinstimmung zwischen wiederholten Messungen.

RICHTIGKEIT: Als Ausdruck der Übereinstimmung zwischen der besten Schätzung einer Größe und ihrem "wahren Wert".

SPEZIFITÄT: Als Ausdruck der Fähigkeit einer analytischen Methode nur diejenige(n) Komponente(n) zu bestimmen, die sie vorgibt, zu messen.

Die verschiedenen ionenselektiven Elektroden erfüllen heute fast alle Punkte der Anforderungen an eine ideale Analysenmethode zur Elektrolytbestimmung (76).

Seit Jahren sind ionenselektive Elektroden im klinisch-chemischen Labor im Einsatz. In den letzten Jahren hat die Technologie der ionenselektiven Elektroden solche Fortschritte gemacht, daß bereits zahlreiche Analysegeräte für den Dauereinsatz im klinisch-chemischen Labor zur Verfügung stehen.

2.1.3.1.1. Meßprinzip der ionenselektiven Elektroden

Die Meßkette zur Bestimmung von Calciumionen besteht aus zwei elektrochemischen Halbzellen: einer Meß-Elektrode mit ionenselektiver Membran und einer Bezugs-Elektrode (Referenz-Elektrode). Beide Elektroden sind mit einem Spannungsgerät verbunden. Durch das Eintauchen der Elektroden in eine Elektrolytlösung wird der Stromkreis geschlossen (Abbildung 1).

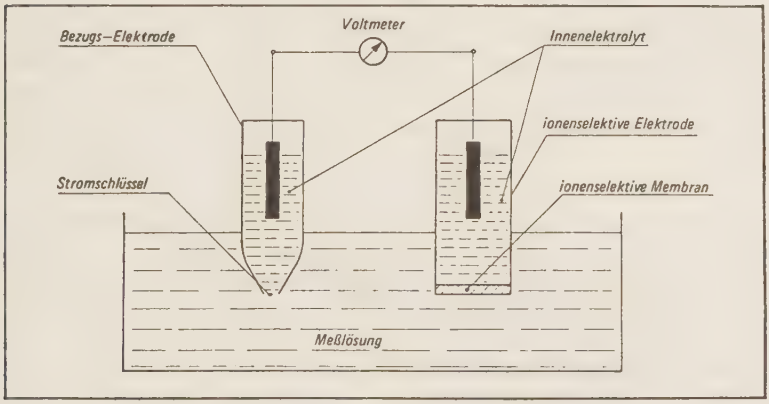

Abb. 1: Schematische Darstellung der Meßkette

Für die Bestimmung der Ionen werden Elektroden benutzt, die als aktive Elektrodenphase einen mit dem betreffenden Ion spezifisch reagierenden Ionenaustauscher besitzen. Der Ionenaustauscher ist meist kovalent an eine polymere Kunststoffmembran gebunden. Ionenselektive Membranen zeichnen sich dadurch aus, daß sie einer Ionenart bevorzugt den Transport von Elementarladungen gestatten. Dieser Transport ist dabei

nicht nur eine Frage des Ionenaustauschergleichgewichts, sondern auch eine Frage der Ionenbeweglichkeit. Im Innern der Elektrode werden die auftretenden Ladungsverschiebungen über die Phasengrenzfläche Membran/innere Füllösung hinweg weitergegeben.

Da die innere Füllung in ihrer Zusammensetzung, die Ableitelemente im Innern der beiden Elektroden und das Diffusionspotential an der Grenzfläche Referenzelektrode/Probelösung konstant gehalten werden, ist das Meßkettenpotential im Idealfall nur das Resultat von elektrochemischen Änderungen an der Außenfläche der Meßelektrodenmembran. Das an der Phasengrenzfläche zwischen Ionenaustauscher-Kunststoffmembran und Probe entstehende Potential folgt über einen weiten Konzentrationsbereich auch bei den Ca^{++}-selektiven Elektroden der NERNST'schen Gleichung.

$$E = E_o + 2{,}303 \ \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot (\lg A_i)$$

E = Elektrodenpotential der Meßkette
E_o = konstantes Standard-Elektrodenpotential
R^o = allgemeine Gaskonstante
T = absolute Temperatur
z = Wertigkeit des Ion
F = Faraday-Konstante
A_i = Aktivität des Meßion

Die Potentialbildung an der ionenselektiven Membran kann durch die Anwesenheit anderer Ionen (sogenannte Störionen) in der Meßlösung beeinflußt werden. Dieser Querempfindlichkeit sind alle Elektrodenmembranen mehr oder weniger unterworfen.

Die praktische Anwendbarkeit einer Ca^{++}-selektiven Elektrode hängt somit u.a. auch von ihrer Fähigkeit ab, möglichst selektiv auf Ca^{++}-Aktivitäten anzusprechen.

ROSS (1967) schlug eine Abwandlung der NERNST'schen Gleichung in der Art vor, daß sich das Ausmaß der Störinterferenz bei der Calciumionenmessung mathematisch ausdrücken läßt.

$$E = E_o + 2{,}303 \ \frac{R \cdot T}{2 \cdot F} \ (A_{Ca^{++}} + \Sigma_i K_i \cdot A_i^{\ 2/z_i})$$

Dabei ist:

A_i = Aktivität eines Störions i
z_i = Wertigkeit eines Störions i
K_i = Selektivitätskonstante

Die Selektivitätskonstante gibt an, wie stark interferierende Ionen (Störionen) die Aktivitätsmessung beeinflussen. Je kleiner diese Konstante ist, desto selektiver ist die entsprechende Membran. Die Beziehung zwischen der gemessenen Ionenaktivität und der allgemein üblich angegebenen Ionenkonzentration wird durch die folgende Gleichung aufgezeigt:

$$a_i = \gamma \cdot c_i$$

a_i = Ionenaktivität
γ = Aktivitätskoeffizient
c_i = Ionenkonzentration

Der Aktivitätskoeffizient γ ist nur in ideal verdünnten Lösungen gleich 1; je höher konzentriert die Lösung wird, desto kleiner wird γ und desto mehr weicht die Ionenkonzentration von der Ionenaktivität ab. In seiner Größe ist der Koeffizient vor allem von der totalen Ionenstärke, der Art des Lösungsmittels, der Temperatur und dem Ionendurchmesser abhängig. In der Praxis reicht es jedoch aus, um Konzentrationsaussagen machen zu können, daß die Temperatur und die totale Ionenstärke von Standards und Proben angeglichen werden (73).

Als Ionenaustauscher dienen bei der Calciumbestimmung langkettige Phosphat-di-ester und Neutral-Träger.

Bei der in Abbildung 1 gezeigten Meßanordnung werden Änderungen in der gemessenen Spannung der Meßkette nur durch die Konzentration des zu messenden Elektrolyts in der Probe hervorgerufen.

2.1.3.1.2. Anwendungscharakteristika der ionenselektiven Elektroden

Die Elektrolytbestimmung mittels ionenselektiver Elektroden kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten (wie Vollblut, Plasma, Serum, Urin und Liquor) direkt ohne Probenvorbereitung und -aufarbeitung durchgeführt werden.

Die ionenselektiven Elektroden zeichnen sich durch einen großen linearen, teilweise über mehrere Konzentrationsstufen reichenden Meßbereich aus. Der für die Durchführung des Messung benötigte Zeitaufwand ist relativ gering.

Ionenselektive Elektroden haben heute ein breites Anwendungsgebiet in der klinisch-chemischen Diagnostik. So können bereits alle klinisch wichtigen Blutgase und -ionen (pH, pCO_2, pO_2, Na^+, K^+, Ca^{++}, Cl^-) mit dieser Meßtechnik erfaßt werden.

Unter Berücksichtigung der oben angeführten Vorteile sowie der guten Spezifität, Präzision, Richtigkeit und der minimal benötigten Probenmenge von unter 500 µl genügen die ionenselektiven Elektroden heute bereits den Anforderungen an eine ideale Analysenmethode zur Elektrolytbestimmung (76, 121).

Obwohl bereits seit mehreren Jahren ionenselektive Elektroden zur Analyse der Calciumionen im Blut zur Verfügung stehen, werden auch heute noch verschiedene Nomogramme bzw. Rechenprogramme bei der Bestimmung des ionisierten Calciums angewendet.

2.1.3.2. Berechnung

Bisher existieren mehrere Nomogramme und Rechenprogramme zur Kalkulation der Konzentration des ionisierten Calciums im Blutplasma. Das erste von McLEAN und HASTINGS 1935 aufgestellte Nomogramm stützte sich auf Messungen des ionisierten Calciums mittels der Froschherzmethode.

Bei bekannten Werten für das Serumprotein (Pr) und Gesamtcalcium (Ca_T) läßt sich aus dem Mc-LEAN-HASTINGS-Nomogramm

das ionisierte Calcium (Ca^{++}) direkt ablesen oder aber nach der Formel:

$$\frac{(\ Ca^{++}\ )\ (\ Pr\ )}{(\ CaPr\ )} = K = 10^{2,22 \pm 0,07}$$

berechnen, wobei diese Formel der Dissoziationsgleichung ($CaPr \rightleftharpoons Ca^{++} + Pr^{--}$), abgeleitet aus dem Massenwirkungsgesetz, entspricht. Diese Formel enthält einige Vereinfachungen wie beispielsweise einen Albumin/Globulin-Quotienten von 1,8 und berücksichtigt nicht die starke Abhängigkeit des ionisierten Calciums von pH, Temperatur, Magnesium und Zitrat. Nach dieser Formel berechneten McLEAN und HASTINGS eine 52%ige Dissoziation des Calciums im Serum des Menschen.

Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Annahme eines stöchiometrischen 1:1-Verhältnisses zwischen Calcium und Proteinat nicht haltbar ist, da Proteinmoleküle eine unterschiedliche Anzahl von Calciumionen binden. Die Bindungskapazität des gleichen Proteins kann sich mit dem Gesundheitszustand ändern (53, 113, 127, 222).

Das Albuminmolekül besitzt 11 - 13 und das γ-Globulin 2 - 3 Bindungsstellen für das Calciumion. Aus den Untersuchungen von LOKEN et al. (1960) geht hervor, daß die α- und ß-Globuline mehr Calcium binden als die γ-Globuline. Nach einer empirischen Formel von MOORE (1970) läßt sich berechnen, daß etwa vier Fünftel des proteingebundenen Calciums an Albumin und ein Fünftel an Globuline gebunden sind. Neben den erwähnten Formeln wurden noch andere empirische Formeln zur Berechnung des ionisierten Calciums aus Gesamtcalcium und Serumprotein vorgeschlagen.

Bereits vor McLEAN und HASTINGS (1935) hatte im Jahre 1926 GREENWALD berichtet, daß jedem Gramm Serumprotein 0,87 mg Calcium entsprechen und daß sich das ionisierte Calcium aus der Differenz zwischen Gesamtcalcium und dem Produkt aus Gesamtprotein in 100 ml Serum x 0,87 berechnen läßt. ZEISLER

(1954) leitete eine weitere Formel zur Berechnung des ionisierten Calciums ab, die wenigstens im Normalbereich des Gesamtcalciums und Proteins annähernd genaue Werte liefert. Die Formel lautet:

$$Ca^{++} = \frac{6\ Ca_{Ges.} - \frac{Pr}{3}}{Pr + 6}$$

Von ROBERTSON (1969) wurden Rechenprogramme vorgestellt, mit deren Hilfe aus den Gesamtkonzentrationen an Calcium, Magnesium, Kalium, Ammonium, Phosphat, Oxalat, Citrat und Sulfat sowie des pH-Wertes und den thermodynamischen Komplexbildungskonstanten von 22 Komplexen, die von den genannten Anionen und Kationen untereinander gebildet werden, die Konzentration des ionisierten Calciums im Serum und Urin berechnet werden kann. Bei dem Vergleich der berechneten mit den durch Messung (Kolorimetrie, ionenselektiver Elektrode) erhaltenen Werten fand er eine brauchbare Übereinstimmung. Auch GARDNER et al. (1981) kalkulierten den Anteil des ionisierten Calciums unter verschiedenen pathologischen Konditionen und Annahme eines konstanten pH-Wertes von 7,4. Sie fanden eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den kalkulierten Werten.

Diese Angaben stehen in krassem Widerspruch zu den von LADENSON et al. (1978a) und von CONCEICAO et al. (1978) gemachten Beobachtungen.

MARSHALL und HODGKINSON (1983) ermittelten, daß die größte Übereinstimmung der kalkulierten Werte mit potentiometrisch gemessenen erreicht wird, wenn sowohl die Proteinkonzentration als auch der pH-Wert der Probe berücksichtigt werden. 1981 wurde von SIGGAARD-ANDERSON et al. ein modifiziertes McLEAN-HASTINGS-Nomogramm vorgestellt. Für die Kalkulation der Konzentration der freien Calciumionen wurde von derselben Arbeitsgruppe ein kartesisches und ein aligmatisches Nomogramm erstellt (259). Berücksichtigt werden dabei zusätzlich der Albumingehalt und der pH-Wert der Plasmaprobe. Die Gesamtproteinskala basiert auf einem Albumin/Globulin-Quotienten von 1,5 (McLEAN und HASTINGS 1935 = 1,8; HANNA et al.

1964 = 1,2) und die Bezugstemperatur ist 37°C (McLEAN und HASTINGS 1935 = 25°C; HANNA et al. 1964 keine Temperaturangabe). Die nach diesen Nomogrammen kalkulierten Werte hatten eine Abweichung von den mittels ionenselektiver Elektroden gemessenen von bis zu 0,20 $mmol \cdot l^{-1}$. Besonders bei pathologischen Fällen wurde die Ungenauigkeit der Kalkulation deutlich.

HARDY (1983) ermittelte mittels des von SIGGAARD-ANDERSEN et al. (1980) beschriebenen Nomogramms unter Berücksichtigung des Gesamtproteins und der Annahme eines pH-Wertes von 7,4 für das freie Calcium einen 95%igen Referenzbereich von 0,99 - 1,36 $mmol \cdot l^{-1}$ und bei Berücksichtigung des Albumingehaltes von 1,02 - 1,35 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Gesamtcalciumgehalt von 1,85 - 2,55 $mmol \cdot l^{-1}$.

1964 wurde von HANNA et al. ein Nomogramm zur Bestimmung des diffusiblen Calciums publiziert.

2.2. CALCIUMFRAKTIONEN IM BLUT

2.2.1. Interaktionen

Das Gesamtcalcium des Blutes liegt, wie bereits auf S. 1 erwähnt, in verschiedenen Fraktionen vor. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß durchschnittlich 1,06 - 1,25 $mmol \cdot l^{-1}$ oder ungefähr 45 % des Gesamtcalciums ionisiert sind (48, 164, 195, 276, 277); durchschnittlich 0,26 - 0,31 $mmol \cdot l^{-1}$, ungefähr 12 % sind komplexgebunden (164, 195, 276, 277) und proteingebunden sind 1,00 - 1,09 $mmol \cdot l^{-1}$ oder 43 % (164, 193, 194, 276).
Das freie ionisierte Calcium unterteilt sich erneut in "elektrostatisch gebundene" (ungefähr 0,87 $mmol \cdot l^{-1}$) und in "aktive" (ungefähr 0,38 $mmol \cdot l^{-1}$) Calciumionen (258).

Die Komplexbindung findet im wesentlichen an das Bikarbonat (0,10 - 0,14 $mmol \cdot l^{-1}$ ungefähr 5 % des Gesamtcalciums; 196, 276) oder als Calciumcitrat (0,08 - 0,10 $mmol \cdot l^{-1}$ ungefähr 3,5 % des Gesamtcalciums; 164, 276) bzw. als Calciumphosphat (0,06 $mmol \cdot l^{-1}$ ungefähr 2,5 % des Gesamtcalciums; 276) statt.

Die Bindung des Calciums an die Proteine geschieht im wesentlichen an das Albumin (73-85 % des proteingebundenen Calciums); an die Globuline sind die restlichen 15-25 % des proteingebundenen Calciums gebunden (198, 199, 200).

Von den Immunglobulinen bindet das IgG sehr wenig Calcium (277). Jeweils geringe Anteile werden an Transferin, α_2-Macroglobulin, Orosomucoid, Praealbumin, α_1-Antitrypsin, ß-Lipoprotein und α_1-Lipoprotein gebunden (164, 250).

Wie die von verschiedenen Autoren durchgeführten Untersuchungen ergaben, besteht zwischen den verschiedenen Calcium-Fraktionen im Blut eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Korrelation. So fanden MÜLLER-PLATHE und LINDEMANN (1983) eine lineare Korrelation zwischen dem Gehalt des ionisierten und dem des Gesamtcalciums. Die prozentuale Fraktion des ionisierten Calciums war dabei jedoch von der Konzentration des ionisierten Calciums im Blut unabhängig.

Frühere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Korrelation zwischen dem ionisierten und dem Gesamtcalcium bei gesunden Probanden nur gering ausgeprägt ist (101, 126, 139, 153, 163, 164, 185, 209, 251).

Bei Patienten mit gestörter Calcium-Homeostase konnte teilweise eine relativ enge Korrelation zwischen ionisiertem und Gesamtcalcium festgestellt werden (127, 163, 164, 295). MOORE (1970) konnte beobachten, daß die Variation des Serumcalciums mit Änderung des proteingebundenen Anteils gekoppelt waren.

Verschiedene Autoren untersuchten die Calciumbindung an den Proteinen unter physiologischen Bedingungen (5, 32, 104, 130, 197, 198, 199, 201, 213).

Es wurde auch festgestellt, daß die Calciumbindung an das Albumin im wesentlichen über die Carboxyl- oder Imidazolgruppen in Konkurrenz mit Wasserstoffionen stattfindet (1).

Die von BESARAB et al. (1981) durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die Calciumbindung an das Albumin ein komplexer Prozeß ist, der sich durch zahlreiche Bindungsstellen mit

unterschiedlicher Affinität und Bindungskapazität auszeichnet. Dadurch wurde klar, daß Korrekturen des Gesamtcalciums unter Berücksichtigung fixer Albuminbindungsgrößen besonders unter hypoalbuminaemischen Zuständen unzulässig sind.

Bisher wurde allgemein angenommen, daß das proteingebundene Calcium als Reservoir für das ionisierte Calcium dient, und das proteingebundene Calcium mit dem ionisierten in einem Gleichgewicht steht, so daß Veränderungen in einem Kompartiment Änderungen des anderen Kompartiments reflektieren. Es wurde jedoch über Fälle berichtet, wo eine Abnahme des ionisierten Calciums bei Aufrechterhaltung der normalen Konzentration des proteingebundenen Calciums zu beobachten war. Diese Resultate ließen die Schlußfolgerung zu, daß das proteingebundene Calcium nicht nur als Reservoir für das ionisierte Calcium dient (50, 72, 87, 263). So sind bei Schockzuständen, bei symptomatischer Hypocalciaemie und nach Hämodialyse eine Abnahme des ionisierten Calciums bei normaler proteingebundener Calcium-Fraktion beobachtet worden.

Auch Kinetikstudien mit intravenös appliziertem radioaktiven Calcium zeigten eine starke Diskrepanz zwischen den gemessenen und den vorausgesagten spezifischen Aktivitäten des Calciums im Plasma. Diese Beobachtungen erhöhten ebenfalls die Wahrscheinlichkeit der Existenz mehrerer nicht im Gleichgewicht stehender Calcium-Pools im Plasma (23, 84, 137, 288).

PAIN et al. (1975) konstatierten bei Albuminbindung des Calciums eine große Variabilität von Subjekt zu Subjekt. Eine lineare Beziehung zwischen dem proteingebundenen Calcium und dem Albumingehalt des Plasmas wurde von MOORE (1970) festgestellt. NIELSEN et al. (1977) beobachteten keinen Effekt der Albiminkonzentration auf den Gehalt des ionisierten Calciums im Blut. Eine inverse Korrelation des ionisierten Calciums zum Albumingehalt wurde von MÜLLER-PLATHE und LINDEMANN (1983) ermittelt.

LADENSON et al. (1978b) berichten, daß es nicht möglich

ist - wie häufig angenommen - den Anteil des ionisierten Calciums aus dem Gehalt an Gesamtcalcium und an Albumin im Serum abzuschätzen. Es wird angedeutet, daß die Interaktion zwischen den Calcium-Fraktionen des Serums komplexerer Natur ist als früher angenommen.

So enthält das Plasma eine Calcium-Fraktion, die so fest an das Albumin gebunden ist, daß sie nicht im Gleichgewicht mit dem ionisierten Calcium steht und damit auch nicht an der Aufrechterhaltung der Konzentration des ionisierten Calciums im Blut beteiligt ist (297, 299).

Die Existenz dieser Unterfraktion von proteingebundenem Calcium hilft die Diskrepanz zwischen dem Konzept, daß proteingebundenes Calcium als Speicher für das ionisierte Calcium dient und den klinischen Beobachtungen, die aufzeigen, daß ein Mißverhältnis zwischen dem proteingebundenen und dem ionisierten Calcium besteht, zu klären.

Es wird angenommen, daß diese Subfraktion ein Komplex aus Calcium, Albumin und Fettsäure ist. So führt die Applikation von Fettsäuren zum Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums bei gleichzeitiger Erhöhung der Affinität des Albumins für Calcium (128, 130, 239, 289, 297, 299).

2.2.2. Physiologische Funktionen

In zahlreichen Arbeiten wird immer wieder betont, daß nur die freie ionisierte Fraktion des Calciums die biologisch aktive Form sei. Dabei bezieht man sich meistens auf die von McLEAN und HASTINGS in den Jahren 1934/35 durchgeführten Untersuchungen.

Die Assoziation der physiologischen Aktivität nur mit dem freien ionisierten Calcium wurde auch durch die Studien über die Parathormonsekretion (254) und die Kontraktilität des Herzens (24, 177) unterstützt, die zeigten, daß an EDTA oder Citrat komplexgebundenes Calcium keinerlei physiologische Aktivität auf diese Prozesse hat. Beide, EDTA und Citrat, ha-

ben eine hohe Bindungsaffinität zu den Calciumionen. Die Bindungsaffinität von Bikarbonat und Phosphat ist wesentlich geringer.

Die von McLEAN und HASTINGS (1934, 1935) und später von TORIBARA et al. (1957), YENDT et al. (1955) und von WALSER (1961) durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß auch das komplexgebundene Calcium biologische Funktionen erfüllt, sei es beim transmembranen Calciumtransport, der Membranbindung (besonders als Bikarbonat- oder als Phosphatkomplex), bei der Calcifizierung (als Phospholipid-Phosphatkomplex) oder bei dem intrazellulären Calciummetabolismus (als Calcium-Phosphat-ATP-Komplex) (221).

In der Literatur gibt es, wie bereits vorher erwähnt (S.19), verschiedene Hinweise, daß Fettsäuren bei der Bindung von Calcium an das Albumin im Blut eine Rolle spielen (130, 239, 297, 299). Dieser Calcium-Fettsäure-Albumin-Komplex stellt eine sehr fest gebundene Fraktion des Calciums dar. Die physiologische Bedeutung dieses Komplexes ist bisher nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, daß dieser Komplex in verschiedene physiologische Prozesse, wie Transport des Calciums durch die Zellmembranen und Knochenstoffwechsel, involviert ist (156, 239, 297, 299).

Die Bedeutung des übrigen proteingebundenen Anteils des Calciums bei der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase ist ebenfalls nicht klar.

Die gesamte diffusible Fraktion ist in der Lage, biologische Membranen wie die Zellmembran und die Gefäßwände zu durchdringen. Die Bedeutung des ionisierten Anteils des Calciums für die verschiedensten Prozesse im Organismus wurde in zahlreichen Experimenten bewiesen.

2.3. EINFLUSS PRÄANALYTISCHER FAKTOREN AUF DIE AUSSAGEFÄHIGKEIT DER ERMITTELTEN WERTE FÜR GESAMTCALCIUM UND IONISIERTES CALCIUM IM BLUT

Die heute eingesetzten Methoden der Calciumbestimmung (Atomabsorption, ionenselektive Elektroden) weisen eine hohe Spezifität und Präzision auf (76, 185, 188).

In der Praxis wird diese Präzision jedoch häufig nicht erreicht, da sich zu den eigentlichen Analysefehlern noch Fehler addieren, deren Ursprung außerhalb des Analyseprozesses liegt. Die Fehler, die durch präanalytische Faktoren verursacht werden (sogenannte präanalytische Fehler), vergrößern die Gesamtstreuung der Meßgrößen. Die Präzision des Meßwertes verschlechtert sich somit, wenn die Gesamtstreuung durch präanalytische Fehler steigt.

Präanalytische Fehler sind Einflüsse auf die zu messenden Parameter, bevor das Untersuchungsmaterial in den eigentlichen analytischen Prozeß eingeht. Sie beeinflussen das Meßergebnis in nicht vorhersehbarer Weise und wirken auf alle Schritte, die zur Erstellung eines Laborwertes führen, ein. Sie können endogen entstehen (physiologische Faktoren, veränderte Stoffwechselbedingungen, diagnostische und therapeutische Maßnahmen) oder exogen verursacht werden (Nichtbeachten der erforderlichen Abnahmebedingungen, falscher Transport und Lagerung des Probenmaterials). So müssen bei der Patientenvorbereitung als mögliche Ursachen präanalytische Faktoren berücksichtigt werden:

Einflußgrößen:

- Alter
- Geschlecht
- Schwangerschaft

Störfaktoren:

- Tageszeit
- Ernährungszustand
- Körperlage
- körperliche Belastung
- vorausgegangene diagnostische und therapeutische Maßnahmen

Bei der Probengewinnung:

- Entnahmeort (venös, arteriell, kapillar)
- Blutentnahme (Stauung, Kanülengröße, Sog, anaerob, aerob)
- Antikoagulanz (Heparin, EDTA, Citrat)
- Verdünnung und Kontamination

Beim Transport und bei der Lagerung:

- Zeit
- Temperatur

Die Fehler durch die Probennahme, die Probenbehandlung und die Probenaufbewahrung lassen sich nur durch Standardisierung der Verfahrensweise ausschalten bzw. gering halten (116).

2.3.1. Abhängigkeit von verschiedenen physiologischen Faktoren

2.3.1.1. Geschlecht und Alter

In zahlreichen Studien wurde das Verhalten des Calciums und seiner Fraktionen in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter der Probanden untersucht.

Altersabhängige Veränderungen des Calciumstoffwechsels haben nämlich besonders im Zusammenhang mit dem Auftreten der Osteoporose von jeher interessiert.

Während von manchen Autoren ein Alterseinfluß auf das Gesamtcalcium des Serums beschrieben wurde (10, 118, 139), fanden andere keinen solchen (101, 270, 285, 296).

KELLY et al. (1976) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß das Gesamtcalcium beim Mann bis zum 45. Lebensjahr ansteigt, um danach wieder kontinuierlich abzusinken. Bei den Frauen wurde bis zum 75. Lebensjahr ein langsamer jedoch sicherer Anstieg des Serumcalciums beobachtet. Erst danach kommt es zu einem langsamen Abfall. Ein ähnliches Verhalten des Calciums bei Frauen wurde von RYCKWAERT et al. (1975) beschrieben.

Bei den Männern im Alter von 15 - 45 Jahren ermittelten KELLY et al. (1976) um 0,05 - 0,20 $mmol \cdot l^{-1}$ höhere Calcium-Werte als bei den Frauen vergleichbaren Alters. Auch HUSDAN et al. (1973) und BRAUMAN et al. (1983b) fanden bei Männern signifikant höhere Calciumspiegel im Serum als bei Frauen. PASCHEN (1975) konstatierte ebenfalls bei Frauen einen um durchschnittlich 0,13 $mmol \cdot l^{-1}$ niedrigeren Calciumgehalt. Der Unterschied zwischen den Frauen und Männern war dabei jedoch nicht signifikant.

Die höheren Calciumspiegel im Serum waren mit einem erhöhten Proteingehalt gekoppelt (107, 118).

HATTNER et al. (1970) und SEAMONDS et al. (1972) konnten keine geschlechtsbezogenen Unterschiede im Gehalt des Calciums im Blut feststellen. In der Konzentration des ionisierten Calciums konnten WISKE et al. (1979) bei unverändertem Gesamtcalcium eine mit dem Alter signifikante Abnahme beobachten. Dies widerspricht den Angaben von CONCEICAO et al. (1978), FOGH-ANDERSEN et al. (1978) und von STUDER et al. (1972), die keine Abhängigkeit des ionisierten Calciums vom Alter sahen.

Signifikante Unterschiede in der Konzentration des ionisierten Calciums bei Männern und Frauen wurden von LADENSON und BOWERS (1973a), LINDGÄRDE (1972) und ROBERTSON und PEACOCK (1968) gefunden. So hatten die Männer signifikant höhere Werte als die Frauen (126, 138, 139, 300).

Keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit vom Geschlecht wurden von anderen Arbeitsgruppen konstatiert (19, 37, 68, 69, 79, 101, 106, 107, 136, 146, 185, 200, 270).

Ein bemerkenswerter Anstieg der Konzentration des ionisierten Calciums wurde bei Frauen nach der Menopause von MARSHALL (1980) ermittelt. Auch während des Menstruationszyklus wurden von PITKIN et al. (1978) Variationen des ionisierten Calciums bis zu 0,10 $mmol \cdot l^{-1}$ registriert.

2.3.1.2. Schwangerschaft und Geburt

Das Verhalten des Calciums während der Schwangerschaft wurde von PITKIN und GEBHARDT (1977) und von TAN et al. (1972) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß es während der Schwangerschaft zu einem Abfall in der Gesamtcalciumkonzentration im Serum kommt. Auch in der Konzentration des ionisierten Calciums kommt es besonders im ersten und dritten Trimester zu einer signifikanten Erniedrigung. Der prozentuale Anteil des ionisierten Calciums am Gesamtcalciumgehalt weist während der gesamten Schwangerschaft einen Anstieg auf. Dies wird auf eine Änderung vor allem des proteingebundenen Anteils bezogen.

Bei der Geburt korrelierte das ionisierte Calcium des Neugeborenen gut mit dem der Mutter. Die Werte waren jedoch um 0,06 - 0,10 mmol $\cdot$ l^{-1} signifikant bei den Neugeborenen höher und der Referenzbereich wesentlich breiter (265, 281).

Unmittelbar nach der Geburt fiel der Spiegel des ionisierten Calciums beim Neugeborenen ab.

2.3.1.3. Rhythmik

Tagesperiodische Schwankungen der physiologischen Funktionen gehören zu den charakteristischen Eigenschaften des Organismus. An nahezu allen Organen und Funktionen sind tagesperiodische Schwankungen nachgewiesen worden. Die Maxima und Minima dieser Schwingungen können dabei beträchtlich vom Tagesmittel abweichen.

So zeigten Untersuchungen über das Verhalten von Calcium und den Calcium-Fraktionen im Blut im Verlauf von 24 Stunden, daß diese mehr oder weniger stark ausgeprägten diurnalen Schwankungen unterliegen (15, 110, 153).

BÖNING et al. (1974) konnten dabei für die Calciumkonzentration im Serum keine Rhythmik beobachten.

Dagegen konnten MAKOWITZ et al. (1981) sowohl für das Gesamtcalcium als auch für das ionisierte Calcium im Serum eine Tagesrhythmik nachweisen. Das Verhalten des Gesamtcalciums war dabei im Zeitverlauf jedoch recht unterschiedlich zu dem des ionisierten Anteils. Das Ausmaß der Schwankungen war jedoch ähnlich. Eine signifikante Korrelation bestand bei diesen Untersuchungen zwischen dem Gesamtcalcium und dem Gesamtprotein (110).

Ausgehend von einem Maximum am Vormittag kommt es beim Gesamtcalcium zu einer stetigen, jedoch fluktuierenden Abnahme bis zur Einstellung eines Minimums am frühen Morgen.

Das Tagesprofil des ionisierten Calciums zeigte Änderungen in der Art, daß es ebenfalls nach einem morgendlichen Maximum (10 - 11 Uhr) zu einem gleichmäßigen Abfall kommt. Nach der Überschreitung eines abendlichen Maximums (18 - 20 Uhr) erfolgt ein erneuter Anstieg. Die Oszillationen der Konzentration betragen dabei bis zu 0,30 $mg \cdot dl^{-1}$ und sind nicht mit Änderungen in der Wasserstoffionenkonzentration verbunden. Aufgrund der Konstanz der Änderungen wird angenommen, daß diese Konzentrationsschwankungen des ionisierten Calciums von physiologischer Signifikanz sind (153). Mit den Änderungen der Calciumionenkonzentration im Tagesverlauf wurden Änderungen des zirkulierenden Parathormons (115, 125, 261) in der Biosynthese des Parathormons (70) und des 1,25-dihy - droxy-Vitamin D_3 (42) gesehen.

Wiederholte Messungen im Verlauf von mehreren Monaten oder Jahren zeigten unterschiedliche Variationen der bestimmten Mittelwerte. So fand MOORE (1970) im Verlauf von zwei Jahren eine Variation von ungefähr 18 % beim Gesamtcalcium und von ungefähr 6 % beim ionisierten Calcium. Bei LADENSON und BOWERS (1973a) zeigten wiederholte Messungen im Verlauf mehrerer Monate (8) eine Variabilität des Gesamtcalciums von 1,9 % und des ionisierten Calciums vom 1,2 %.

Ferner konnte ermittelt werden, daß bei männlichen Personen die Serumcalciumwerte im Sommer um etwa 0,02 - 0,04 $mmol \cdot l^{-1}$ höher liegen als im Winter (140).

Bei Frauen in der Postmenopause liegen die Werte im Winter, obwohl ein zweiter Gipfel in den Monaten Mai und Juni besteht, generell höher (2).

2.3.1.4. Ernährungsstatus

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß die Ernährung Einfluß auf klinisch-chemische Parameter im Blut hat, und dies war Gegenstand verschiedenster Untersuchungen.

Dabei wurde sowohl der Effekt der Nahrungsaufnahme - ohne daß dabei immer genügend die Nahrungszusammensetzung berücksichtigt wurde - als auch einer mehr oder weniger langen Fastenperiode ermittelt.

ISHIDA et al. (1983) konnten im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme keine Schwankungen des Gesamtcalciums im Serum feststellen.

Den Effekt der Nahrungsaufnahme auf das ionisierte Calcium im Blut untersuchten auch andere Autoren; sie kamen dabei zu teilweise recht widersprüchlichen Resultaten (37, 126, 139, 251, 270). So fanden CONCEICAO et al. (1978), LINDGÄRDE und ZETTERVALL (1971) sowie STUDER et al. (1972) keinen Nettoeffekt der Nahrung auf das ionisierte Calcium.

SEAMONDS et al. (1972) notierten einen gleichmäßigen Abfall in der Konzentration des ionisierten Calciums nach der Nahrungsaufnahme. Sowohl einen Anstieg als auch einen Abfall in dem Gehalt des ionisierten Calciums im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme sahen LADENSON und BOWERS (1973a). Aus diesen divergierenden Beobachtungen geht hervor, daß sicherlich bei den durchgeführten Untersuchungen noch andere Faktoren (wie Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme, Zusammensetzung der Nahrung) eine Rolle spielten, die nicht detailliert dargelegt wurden. Tatsache ist es jedoch, daß es durch die Nahrungsaufnahme zu einer Veränderung der Konzentration des ionisierten Calciums kommt und daß das Ausmaß dieser Änderung eine starke Abhängigkeit von der Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung und von dem Zeitpunkt der Nahrungsauf-

nahme zeigt. Festgestellt wurde außerdem, daß das Serumcalcium im nicht nüchternen Zustand höher ist als nach einer nächtlichen Fastenperiode (149, 192).

STEIN et al. (1983) untersuchten den Effekt einer längeren Fastenperiode (8 Tage) auf das Verhalten des Calciums im Blut und im Urin. Der Gesamtcalciumgehalt des Blutes blieb über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Im Kontrast zum stabilen Gesamtcalcium stieg die Konzentration des ionisierten Calciums am Ende der Fastenperiode um etwa 0,20 $mg \cdot dl^{-1}$ bei begleitender metabolischer Azidose an.

Diese Untersuchungen zeigen deutlich, daß es schwierig sein kann, die Ergebnisse nicht gefasteter Personen zu interpretieren. Es wird daher die Bestimmung sowohl vom Gesamtcalcium als auch vom ionisierten Calcium nach einer nächtlichen Fastenperiode empfohlen. Bei der geforderten Nahrungskarenz von 12 Stunden ist dem Patienten aber unbedingt eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr zu gewähren, da es sonst zu Flüssigkeitsmangel und dadurch fälschlich zu erhöhten Werten kommt.

2.3.1.5. Körperlage

Die Änderung der Körperlage ist mit entscheidend für die Wasserverteilung zwischen intra- und extravasalem Raum. Nach der Molekularsiebtheorie von LANDIS und PAPPENHEIMER (1963) können Moleküle, deren Durchmesser kleiner als 40 nm ist, die Gefäßmembran mit der Flüssigkeit passieren.

Bei Gesunden, die 12 Stunden lagen, vermindert sich beim Übergang in die senkrechte Körperlage das Plasmavolumen innerhalb von 10-15 Minuten um etwa 10 %, bei entsprechendem Anstieg der Konzentration hochmolekularer Teilchen. Die Gesamteiweißkonzentration steigt dabei um 10 % an (63). Auch BRAUMAN et al. (1983), DIXON und PETERSON (1978) sowie HUSDAN et al. (1973) stellten beim Wechsel vom Liegen zum Stehen einen signifikanten Anstieg in den Konzentrationen des

Gesamtcalciums, der Plasmaproteine und der proteingebundenen Substanzen fest. Das ultrafiltrierbare und das ionisierte Calcium zeigten beim Lagewechsel keine signifikanten Änderungen.

Ähnliches wurde auch bereits von PEDERSEN (1972c) beobachtet. RENOE et al. (1979) registrierten einen Abfall in der Konzentration des ionisierten Calciums beim Wechsel von aufrechter in liegende Position.

Während einer langen Bettruhe kommt es zu einer deutlichen Änderung in der Gesamtcalciumkonzentration und zu einem Anstieg des ionisierten Calciums (102). Dies steht im Zusammenhang mit dem veränderten Calciummetabolismus bei Immobilisation und der damit verbundenen erhöhten Knochenresorption. Dieses Phänomen ist möglicherweise auch verantwortlich für die teilweise höheren Normbereiche des Gesamtcalciums und des ionisierten Calciums bei stationären Patienten (105, 176).

Die niedrigsten Werte für das Gesamtcalcium und für die Plasmaproteine wurden bei liegenden Patienten gemessen (107).

Die mit dem Lagewechsel auftretenden Änderungen der Calcium- und Proteinkonzentrationen waren vollständig reversibel. Der ursächliche Mechanismus ist unklar und es scheinen dabei zahlreiche Faktoren involviert zu sein.

Die Konstanz der Konzentration des ionisierten Calciums wird darin gesehen, daß die Permeabilität der Gefäßwände für das ionisierte Calcium durch einen veränderten Filtrationsdruck nicht beeinflußt wird. Ungefähr 20 Minuten nach erfolgtem Lagewechsel ist in den verschiedenen Konzentrationen ein neues steady state eingestellt.

2.3.1.6. Körperliche Belastung

Nicht nur körperliche Spitzenleistungen, sondern auch die tägliche normale körperliche Belastung kann die Aussagefähigkeit der Laborwerte beeinflussen. Vor allem die Verände-

rungen des Plasmavolumens, des pH-Wertes, der Laktat- und Pyruvat-Konzentration beeinflussen sekundär andere Parameter. Die Hämokonzentration, die durch den Verlust von Wasser und niedermolekularen Plasmabestandteilen zustande kommt, führt zu teilweise recht deutlichen Anstiegen in den Serumelektrolyten und des Gesamteiweißes (268). So konnte nach intensiver Belastung bei einigen Probanden ein Anstieg des Calciums bis zu 44,9% des Ausgangswertes beobachtet werden. NIELSEN et al. (1977) untersuchten das Verhalten von Gesamtprotein, Gesamtcalcium, ionisiertem Calcium, Laktat und pH in Abhängigkeit von einer 10-minütigen Ergometrie mit einer 70- bis 80%igen Ausbelastung. Unmittelbar nach Belastungsbeginn kam es zu einem deutlichen Anstieg in den Konzentrationen von Protein, Calcium und Laktat im Serum bei abfallendem pH-Wert. In der 10. Belastungsminute war das Protein von 68,5 auf 77,9 $g \cdot l^{-1}$, das Gesamtcalcium von 2,43 auf 2,64 $mmol \cdot l^{-1}$, das ionisierte Calcium von 1,21 auf 1,32 $mmol \cdot l^{-1}$, das Laktat von 0,86 auf 8,41 $mmol \cdot l^{-1}$ angestiegen und der pH von 7,45 auf 7,34 abgefallen.

Nach Abbruch der Belastung kam es innerhalb von 30 Minuten zur Einstellung der Ausgangswerte bei allen untersuchten Parametern.

Die Korrelation zwischen Änderung in der Konzentration des ionisierten Calciums und pH-Wert war bei diesen Untersuchungen während der Belastung identisch mit der unter in vitro-Bedingungen ermittelten Größe. Es wurde jedoch auch deutlich, daß diese Beziehung unter in vivo-Bedingungen von zahlreichen anderen Faktoren abhängig ist und stärkeren Variationen unterliegt als in vitro beobachtet.

WILLS (1970) sah bei einer normalen körperlichen Belastung und Ernährung eine diurnale Variation des Serumcalciums von ungefähr 0,03 $mmol \cdot l^{-1}$. Im Blut von fastenden Probanden betrug die Schwankung nur 0,02 $mmol \cdot l^{-1}$ korrigiert auf eine konstante Proteinkonzentration.

2.3.1.7. Komplexbildende Substanzen

Die Homeostase des Calciums im Organismus wird auch stark durch Veränderungen in der Konzentration von mit Calcium komplexbildenden Substanzen (Laktat, Citrat, Carbonat, Phosphat, Proteine, Heparin) beeinflußt (21, 43, 67, 87, 117, 168, 203, 284). So kommt es bei der erhöhten Bildung von Laktat im Organismus oder bei dessen parenteraler Zufuhr zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der Calciumionenkonzentration (175, 244).

Bei einer parenteralen Zufuhr von Citrat (ACD-BLUT) kommt es ebenfalls zu einem deutlichen Abfall vom Gesamtcalcium- und vom ionisierten Calciumgehalt im Blut (279, 284). Eine rasche Eliminierung des Citrates aus dem Blut bedingt eine ebenso rasche Rückkehr der Konzentration des Calciums auf annähernde Ausgangswerte (284).

BRICKER et al. (1968) zeigten, daß die ionisierte Calciumfraktion durch Phosphatbindung im Blut vermindert werden kann. Hyperphosphataemie, ein ständiges Begleitmerkmal der chronischen Niereninsuffizienz, kann somit über die Komplexbildung der Calciumionen zur Auslösung eines sekundären Hyperparathyreoidismus führen. Das ionisierte Calcium ist nämlich der erste Mittler, über den die Parathormonsekretion reguliert wird (31, 254).

Die Korrektur einer Azidose mit alkalischen Lösungen führte bei den Untersuchungen von BISWAS et al. (1981) zu einer Senkung des ionisierten Calciums um etwa 0,03 $mmol \cdot l^{-1}$. DROP et al. (1978) als auch VOGEL et al. (1983) konnten bei der Antikoagulation mit Heparin (375 $I.E. \cdot kg^{-1}$) keinen signifikanten Effekt auf das ionisierte Calcium feststellen. Auch die Zufuhr von Protaminsulfat (5,75 $mg \cdot kg^{-1}$) blieb ohne Einfluß auf den Calciumgehalt des Blutes.

ORELL (1971) und SACHS et al. (1972) sahen, daß das Gesamtprotein und das Albumin den Calciumgehalt des Serums beeinflussen. So kommt es bei zahlreichen Änderungen der Albumin-

konzentration im Blut zu begleitenden Verschiebungen im Gesamtcalciumgehalt (11, 83, 107, 108, ,165, 191, 267). Sowohl MOORE (1970) als auch NIELSEN et al. (1977) konnten keinen Effekt der Albuminkonzentration auf das ionisierte Calcium feststellen.

Demgegenüber ermittelten sowohl DROP et al. (1982) als auch MÜLLER-PLATHE und LINDEMANN (1983) eine inverse Korrelation des ionisierten Calciums zum Albumingehalt des Blutes. Sie beobachteten einen Abfall der Calciumionenkonzentration mit steigendem Albumingehalt. DROP et al. (1982) schließen aus ihren Untersuchungen, daß eine rasche intravenöse Albumininfusion zu einer Erniedrigung der Konzentration des ionisierten Calciums führt und so den dabei zu beobachtenden vorübergehenden Abfall von Blutdruck und Pumpfunktion des Herzens bedingt (49, 51, 245, 269).

2.3.1.8. Säure-Basen-Status

Der Einfluß von Säure-Basen-Verschiebungen auf die Serum-Calcium-Fraktionen wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben und auch quantitativ unter in vivo-Bedingungen untersucht (9, 27, 48, 73, 82, 138, 151, 164, 196, 197, 241, 251, 273). So untersuchten SEAMONDS et al. (1972) den Effekt einer Hyperventilation (respiratorische Alkalose) auf das Verhalten des Calciums im Blut. Sie stellten fest, daß es während der Hyperventilation zu einem Anstieg des Gesamtcalciums und des pH-Wertes bei gleichzeitigem Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums kommt.

Der Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums bei steigendem pH-Wert ist dabei im wesentlichen durch eine vermehrte Bindung der Calciumionen an den Serumproteinen bedingt. Durch Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration werden an den Proteinen Bindungsstellen frei, die mit Calciumionen abgesättigt werden (93, 100, 144, 164, 175, 193, 196, 197, 198, 204, 280).

Einen Anstieg der Gesamtcalciumkonzentration nach einer Hyperventilation wurde auch von GEORGE et al. (1964) ermittelt. SALTZMAN et al. (1963) konnten dagegen keine signifikanten Änderungen im Gesamtcalciumgehalt des Blutes im Zusammenhang mit einer Hyperventilation erfassen.

Auch FUCHS (1974) fand bei Hyperventilation einen nahezu konstanten Gesamtcalciumgehalt bei ansteigendem pH und abfallender Konzentration des ionisierten Calciums. Die Änderung des ionisierten Calciums war dabei 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einer Verschiebung des pH um 0,1 Einheit. Dies stimmte gut mit den Angaben von PEDERSEN (1971a) und SEAMONDS et al. (1972) überein.

SEAMONDS et al. (1972) fanden, daß es bei einer durch die Nahrungsaufnahme bedingten Alkalose (respiratorischer und metabolischer Genese) ebenfalls zu einem Anstieg des Gesamtcalciumgehaltes und des pH-Wertes bei begleitendem Abfall der Calciumionenkonzentration kommt. Der Abfall in der Konzentration des ionisierten Calciums resultierend aus der metabolischen Alkalose war signifikant größer als bei der respiratorischen. Er betrug hier 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ je 0,1 Einheit pH.

PEDERSEN (1971a) stellte bei seinen Untersuchungen keinen unterschiedlichen Effekt seitens der pH-Änderung auf die Konzentration des ionisierten Calciums bei respiratorischer bzw. metabolischer Alkalose fest. Unter in vivo-Bedingungen kommen besonders die Einflüsse seitens der Albumin-, der Bikarbonat- und der Laktatkonzentration und der Änderung in der Plasmawasserkonzentration, die zu osmotischen Wasserbewegungen durch die Erythrozytenmembran führen, zum Tragen. Das Ausmaß dieser Änderungen ist nicht vorhersehbar (256).

Unter in vivo-Bedingungen ist die Änderung des ionisierten Calciums pro pH-Einheit möglicherweise auch deshalb geringer, weil die Änderung des pCO_2 mit einer raschen Äquilibrierung zwischen Blut und Interstitialflüssigkeit verbunden ist. Die hier dargelegten Fakten unterstreichen deutlich, daß bei der

Analyse der ionisierten Calciumkonzentration sowohl im Organismus als auch in der Probe die Wasserstoffionenkonzentration berücksichtigt werden sollte.

Verschiedene Autoren versuchten, den Einfluß der veränderten Wasserstoffionenkonzentration in vivo und in vitro durch Korrektur der gemessenen Werte des ionisierten Calciums auf einen pH-Wert von 7,4 auszugleichen (260, 273).

2.3.2. Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen der Probengewinnung

2.3.2.1. Entnahmeort

Für die klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen kommen vor allem Kapillarblut und Venenblut in Frage, da Arterienblut schwieriger zu entnehmen ist. Die Zusammensetzung des Blutes ist in den verschiedenen Gefäßgebieten unterschiedlich, und viele Blutbestandteile zeigen besonders im Kapillarblut eine rasche zeitliche Änderung ihrer Konzentration.

Darüber hinaus muß auf die schlechte Präzision der kapillären Blutentnahme hingewiesen werden, da die Konzentration der Blutbestandteile im Kapillarblut in Abhängigkeit vom Gefäßwiderstand und durch veränderte Abfiltration ständig schwanken. Außerdem besteht noch die erhöhte Gefahr der Hämolyse, die ebenfalls zu einer fehlerhaften Messung führen kann.

Die Entnahme aus einem Verweilkatheter ist problematisch, da das Totvolumen des Katheters häufig nicht berücksichtigt wird. Es ist dabei auch nicht zu verkennen, daß die Konzentration der Substanzen, die einen starken Einfluß auf die Homöostase des Calciums im Blut haben (Wasserstoffionen, Laktat, Pyruvat), in unterschiedlicher Konzentration im Kapillar-, Venen- und Arterienblut vorliegen.

Aus der Literatur sind bisher nur vereinzelte Untersuchungen zum Verhalten der Calcium-Fraktionen in Abhängigkeit vom Entnahmeort bekannt.

So berichten DROP et al. (1978, 1982), daß nur geringe, nicht signifikante Unterschiede in der Calciumionenkonzentration zwischen arteriellem und venösem Blut bestehen.

WANDRUP und KANCIR (1983) fanden keine Differenzen zwischen kapillarem und arteriellem Blut in der Konzentration des ionisierten Calciums. Geringe, jedoch signifikante Unterschiede bestanden zwischen arteriellem und venösem Blut.

Detaillierte Untersuchungen zur Klärung dieser Problematik liegen bisher nicht vor.

2.3.2.2. Blutentnahme - Stauung

Bei der venösen Blutentnahme ist größtenteils zum Einstich der Nadel eine mehr oder weniger lange Stauung notwendig. Ähnlich wie die Änderung der Körperlage wirkt sich auch die venöse Stauung auf die Konzentration der Blutbestandteile aus. Die Stauung bewirkt einen erhöhten Abstrom von Flüssigkeit aus dem intravasalen Raum. So führt eine zunehmende Stauung (bis zu 10 Minuten) zu einem Anstieg der Serumproteinkonzentration bis zu 20 % (181).

JUNGE et al. (1978) stellten fest, daß es bei einer Stauzeit von 6 Minuten mit einem Druck von 50 mm Hg (6,7 kPa) zu einem signifikanten Anstieg des Gesamtproteins von 7 %, des Albumins von 8,2 % und des Gesamtcalciums von 4,6 % kommt. Ein ähnliches Verhalten der Proteine bei venöser Stase wurde von RYAN und MASAREI (1979) und des Gesamtcalciums von BERRY et al. (1973), CHRISTIANSEN et al. (1975), DENT (1962), HUSDAN et al. (1974) sowie von PAIN et al. (1975) beobachtet.

Nach den Angaben von BERRY et al. (1973), HUSDAN et al. (1974), LI und PIECHOCKI (1971) und von SUBRYAN et al. (1972) kommt es während der venösen Stauung zu keiner signifikanten Änderung in der Konzentration des ionisierten Calciums.

RENOE et al. (1980) konnten bei einer 3-minütigen Stauung

mit einem Druck von 100 mm Hg (13,4 kPa) in der ersten Minute nach Stauende einen Anstieg des Proteins um 5,9 %, des Albumins um 6,9 %, des Gesamtcalciums um 2,4 % und des ionisierten Calciums um 2,0 % im Serum ermitteln. In Übereinstimmung mit SUBRYAN et al. (1972) wurde dabei jedoch keine signifikante Änderung in der Wasserstoffionenkonzentration im Verlaufe der Stauung gesehen.

Wurde der gestaute Arm während der Stase aktiv bewegt, so stiegen die Veränderungen im Gesamtprotein und im Albumin um 12,4 %, im Gesamtcalcium um 8,4 % und im ionisierten Calcium auf 8,6 % bei gleichzeitiger Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration um 28,9 % an. Die Änderung des pH-Wertes um 0,1 Einheit wurde als Ursache für den Anstieg der Konzentration des ionisierten Calciums angesehen.

Ungefähr 2 bis 3 Minuten nach Beendigung der venösen Stauung kehren alle Werte auf das Ausgangsniveau zurück.

Die teilweise doch recht unterschiedlichen Angaben über das Ausmaß der durch Stauung bedingten Veränderungen in der Blutzusammensetzung, besonders hinsichtlich des Verhaltens des ionisierten Calciums, sind zum Teil auf das unterschiedliche methodische Vorgehen (differierender Staudruck und Staudauer, gleichzeitige Armbewegung) bei der Blutentnahme zurückzuführen.

2.3.2.3. Blutentnahme - anaerob

Die Probengewinnung (Vollblut, Serum oder Plasma) zur Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums als auch der ultrafiltrierbaren Fraktion des Calciums sollte unter streng anaeroben Bedingungen erfolgen, um CO_2-Verluste, die eine pH-Verschiebung zur Folge haben, zu vermeiden. Durch Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration werden an den Proteinen Valenzen frei, die mit Calciumionen abgesättigt werden, so daß sich das Gleichgewicht an den Proteinen zugunsten der Calciumionen verschiebt. So kommt es bei steigen-

dem pH zu einer Abnahme des ionisierten Calciums (9, 48, 69, 110, 159, 164, 185, 229, 249) und des ultrafiltrierbaren Calciums (144, 185, 196, 197, 213) bei konstantem Gesamtcalciumgehalt in der Blutprobe. Die steigende Bindung des Calciums an den Serumproteinen mit steigendem pH-Wert spiegelt sich in einer Zunahme der proteingebundenen Fraktion wider (93, 100, 144, 164, 175, 193, 196, 197, 198, 204, 280).

Bei all den unter in vitro-Bedingungen pH-induzierten Änderungen des ionisierten Calciums konnte eindeutig eine lineare inverse Korrelation zwischen der Konzentration der Calciumionen und dem pH-Wert ermittelt werden. Bei Equilibrierungsversuchen mit verschiedenen pCO_2 wurde für das Vollblut ein Verhältnis $\Delta lgcCa^{++}/\Delta pH$ von $-0,22 \pm 0,04$ und für das Serum von $-0,24 \pm 0,04$ ($X \pm 2$ SD) ermittelt (68, 69, 273, 274).

Ebenfalls einen Wert von $-0,23$ für das Serum wurde bei CO_2-Equilibrierung für den pH-Bereich von 7,2 - 7,6 bereits von MOORE (1969), NIELSEN et al. (1977) und von PEDERSEN (1972a) gefunden.

Bei einer pH-Änderung durch Titration mit HCl, NaOH bzw. Laktat wurden im Serum dagegen andere Verhältnisgrößen festgestellt als bei der CO_2-Begasung (262, 273).

Es konnte auch gezeigt werden, daß eine pH-Änderung auf die Relation des ionisierten zum proteingebundenen Calcium einen größeren Einfluß hat, als auf das komplexgebundene Calcium. Es konnte festgestellt werden, daß zwischen dem Albumingehalt der Blutprobe und dem Ausmaß der Änderung im ionisierten Calcium pro pH-Einheit eine enge Korrelation besteht. So wurde bei höherem Albumingehalt eine stärkere Änderung der Konzentration des ionisierten Calciums pro pH-Einheit als bei niedrigem gemessen (87).

Die unter in vitro-Bedingungen nachgewiesene signifikante Abhängigkeit der Calciumkonzentration von der Wasserstoffionenkonzentration und das besondere Ausmaß der Albuminbindung fanden in zahlreichen Nomogrammen zur Ermittlung des protein-

gebundenen oder des ionisierten Anteils des Calciums ihren Niederschlag (164, 259).

Auf die Besonderheiten der Beziehung zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und den Calciumfraktionen unter in vivo-Bedingungen wurde bereits auf Seite 31 und 32 näher eingegangen.

Die oben aufgeführten Daten machen deutlich, welche Bedeutung der anaeroben Blutentnahme und Probenaufbewahrung zukommt.

Zur anaeroben Probengewinnung wurden je nach Arbeitsgruppe entweder die Paraffinöl-Technik (73, 101, 138, 164, 220, 270), die Vacutainer^{R}-Technik (73, 79, 102, 126, 127, 136, 179, 185, 240, 271) oder die Spritzen-Technik (19, 77, 260) eingesetzt.

Bei der Paraffinöl-Technik wird das Blut unter Paraffinöl geschichtet und zentrifugiert. Das so gewonnene Serum oder Plasma wird dann erneut unter Paraffinöl aufbewahrt.

Bei der Vacutainer^{R}-Technik wird das Blut in teilweise nachevakuierten, silikonisierten und mit einem Gummistopfen verschlossenen Röhrchen gefüllt. In der so gewonnenen Blutprobe kann die Messung direkt oder die Lagerung bzw. die Zentrifugation zur Serum- oder Plasmagewinnung erfolgen. Bei einem Vergleich beider Techniken konnten FUCHS (1974) und auch PASCHEN (1975) feststellen, daß es in den Proben unter Paraffinöl innerhalb einer Stunde bereits zu einem Abfall des pCO_2 (bis zu 8 mm Hg) und entsprechendem Anstieg des pH (um etwa 0,03) kommt. Die Konzentration des ionisierten Calciums fiel dabei um 0,03 $mmol \cdot l^{-1}$ ab. Bei den Vacutainer^{R}-Proben hingegen waren nach einer Stunde keine signifikanten Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums, dem pCO_2 und dem pH abzulesen.

Heute, nachdem die Bestimmung des ionisierten Calciums direkt im Vollblut möglich ist, wird immer mehr die anaerobe Spritzen-Technik und sogar auch bereits die Kapillar-Tech-

nik bei der Probengewinnung eingesetzt (132, 260, 286).

Die Kautelen sind dabei identisch wie bei der bereits seit Jahren vorgenommenen Analyse des Säure-Basen-Blutgas-Status. Der Totraum der Spritze (Einmalspritzen) wird mit einem Antikoagulanz gefüllt und die Proben unmittelbar nach der Entnahme und dem Entfernen möglicher Luftbläschen mit einem Stöpsel zur Wahrung anaerober Bedingungen verschlossen.

2.3.2.4. Blutentnahme - Antikoagulation

Für die Gewinnung von Plasma bzw. zur Vermeidung möglicher Systemverstopfung bei der direkten Bestimmung des ionisierten Calciums im Vollblut ist der Einsatz von Antikoagulantien unumgänglich.

Da die herkömmlichen Substanzen wie Citrat, EDTA und Oxalat mit dem Calcium der Probe Komplexe bilden und somit zu einer Verfälschung der fraktionellen Verteilung führen, ist ihr Einsatz unbedingt zu vermeiden (164).
So befaßten sich zahlreiche Autoren mit der Frage, in welchem Ausmaß es beim Einsatz von Heparin als Antikoagulanz unter in vitro-Bedingungen zu einer Veränderung der Calciumfraktion der Blutprobe kommt.

Auf den Gesamtcalciumgehalt hat die Applikation von Heparin zur Blutprobe bei der Bestimmung mittels Atomabsorption keinen Effekt (185); eine Konzentrationsminderung tritt jedoch bei der Messung mittels Flammenphotometrie ein (103, 185). Daß es durch Heparin zu einer Veränderung der Konzentration des ionisierten Calciums in der Probe kommt, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (14, 19, 48, 73k 106, 126, 133, 136, 164, 179, 194, 220, 275). So führt Heparin in einer konzentrationsabhängigen Weise zu einem signifikanten Abfall der Calciumionenkonzentration. Das festgestellte Ausmaß des Heparineffektes schwankte bei den einzelnen Autoren stark. So konnten BISWAS et al. (1981) bereits beim Einsatz von 2 I.E. Heparin je ml Blut einen Abfall der Calciumionen-

konzentration von 0,02 $mmol \cdot l^{-1}$ feststellen. BRUUN (1980), DROP et al. (1978), RADDE et al. (1971) und TØRRING und SJÖBERG (1983) fanden dagegen bis zu einer Heparinkonzentration von 20 I.E. je ml Blut noch keinen signifikanten Abfall des ionisierten Calciums. In höheren Heparin-Konzentrationen kam es jedoch in allen Fällen zu signifikanten Änderungen der Calciumionenkonzentration, wobei eine Bildung von Heparin-Calcium-Komplexen angenommen wird.

LARSSON und ÖHMAN (1978) halten auch einen direkten Effekt des Heparins auf das Brückenpotential als Ursache der verminderten potentiometrischen Calciumionen-Messung für möglich.

2.3.3. Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen der Probenbehandlung

2.3.3.1. Transport und Lagerung

Ein entscheidender präanalytischer Faktor ist die Fehlermöglichkeit, die durch unsachgemäßen Probentransport und falsche Lagerung auftreten kann.

Kenntnis über die Haltbarkeit der Blut-, Plasma- und Serum-Proben unter den verschiedensten Transport- und Lagerungsbedingungen wurde in den verschiedensten Studien gewonnen. Wegen der Möglichkeit einer Fehlfunktion des Systems muß auch die Notwendigkeit einer Probenlagerung über längere Zeitabstände berücksichtigt werden (19, 37, 64, 69, 73, 106, 136, 139, 151, 164, 175, 179, 185, 212, 248, 249, 270, 271, 274). Die Frage der optimalen Lagerungstechnik und des maximalen Lagerungszeitraumes der Proben wird von den verschiedenen Autoren unterschiedlich beantwortet.

Beim Transport und der Lagerung von Vollblut kann es vor allem zu einem Austritt zellulärer Bestandteile in das Plasma oder Serum, dem Verbrauch von Substraten und der Anhäufung von Produkten des Zellstoffwechsels kommen. Beim Transport und der Lagerung des Materials ohne zelluläre Ele-

mente kommt es außerdem zu Entmischungseffekten, Denaturierung und Proteolyse von Proteinen, enzymatischem Abbau von Substraten, Entstehung von Stoffen, die zur Verfälschung der Analyse führen, Diffusion von Gasen (CO_2, O_2) und bakterieller Zersetzung.

Das Ausmaß der Änderungen ist dabei im wesentlichen von der Art der Aufbewahrung (in Röhrchen unter Paraffin, Vacutainer^R, Spritzen, Kapillaren), dem Probenmaterial (Vollblut, Serum, Plasma), der Lagerungstemperatur (4, 20-25°C, 37 oder -19°C) und der Lagerungszeit abhängig. Bei allen Untersuchungen wurde deutlich, daß es besonders bei der Probennahme in Röhrchen unter Paraffin zu den deutlichsten Veränderungen der Calciumfraktion im Blut unter den verschiedensten Bedingungen kommt. Die zu beobachtende Abnahme der Calciumionenkonzentration wird vorwiegend auf die zu messende pCO_2-Erniedrigung und der daraus resultierenden Alkalose zurückgeführt. Bei der Lagerung in Vacutainer^R oder Spritzen kommt es zu einem Anstieg der Calciumionenkonzentration in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer, der vor allem auf den Erythrozyten- und Leukozyten-Stoffwechsel mit der daraus resultierenden Azidose zurückgeführt wird (73).

Eine starke Abhängigkeit der zu beobachtenden Veränderungen von der Lagerungstemperatur wurde festgestellt. Bei der kurzzeitigen Aufbewahrung der Blutproben bei Zimmertemperatur oder 37°C konnten von FEISTEL et al. (1982) im Verlauf einer Stunde und von ISHIDA et al. (1983) im Verlauf von vier Stunden keine signifikanten Änderungen in der Calciumionenkonzentration gemessen werden.

Bei einer Lagerung der Proben (Vollblut, Serum, Plasma) bei 4°C konnten verschiedene Autoren sogar erst nach Tagen mehr oder weniger stark ausgeprägte Veränderungen (Abfall) des ionisierten Calciums feststellen (19, 106, 136, 185). Trotzdem sollte die Analyse auch bei der Lagerungstemperatur von 4°C in Vacutainer^R und Spritzen innerhalb von 8 Stunden nach

Probennahme durchgeführt werden (73, 126, 179).

Tiefgefrorene Proben (Serum, Plasma) zeigten bis zu 72 Stunden keine signifikanten Änderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums (69, 139, 248, 249, 270, 271).

Bei einer Lagerung von Seren bei -20°C kam es im Verlauf von 6 Monaten zu einem nicht signifikanten Abfall der meßbaren Calciumionenkonzentration. Nach 12-monatiger Lagerung war der Ausgangswert von durchschnittlich $1,24 \pm 0,14$ signifikant auf $1,07 \pm 0,14$ $mmol \cdot l^{-1}$ abgefallen (212).

Bei längerer Lagerung wird zur Wiederherstellung des originalen pH-Wertes eine Reäquilibrierung mit CO_2 empfohlen (248).

2.4. EINFLUSS ANALYTISCHER FAKTOREN AUF DIE AUSSAGEFÄHIGKEIT DER ERMITTELTEN WERTE FÜR DAS IONISIERTE CALCIUM IM BLUT

2.4.1. Temperaturabhängigkeit der Messung

Selbst bei der Annahme, daß ein physiologisch wichtiger Parameter bei einer Temperatur von 37°C bestimmt werden müßte, ist dies nicht immer durchführbar. So erfolgte die Messung der Konzentration des ionisierten Calciums mittels der verschiedensten Methoden bei teilweise recht unterschiedlichen Temperaturen. Eine temperaturabhängige Empfindlichkeit der eingesetzten Meßmethoden wurde von verschiedenen Autoren nachgewiesen.

So fanden GUPTA (1967) bei dem Gebrauch der Kolorimetrie mit Murexid und PEDERSEN (1970) mit Tetramethylmurexid eine zunehmende Empfindlichkeit der Methode mit sinkender Temperatur.

LOKEN et al. (1960) stellten bei ihren Ultrazentrifugationsuntersuchungen bei 25°C eine um 5-6 % höhere Konzentration des ionisierten Calciums als bei 37°C fest. Bei der Messung des ionisierten Calciums im Blut mittels ionenselektiver

Elektroden wurde übereinstimmend konstatiert, daß die bei einer Meßtemperatur von 25 °C gewonnenen Werte um durchschnittlich 2 - 7 % höher liegen als die bei 37 °C ermittelten (96, 126, 164, 229).

ROBERTSON (1969) hält es für möglich, daß der bei 37 °C zu messende niedrigere Calciumionenspiegel ein Resultat der größeren Stabilität verschiedener Calciumkomplexe bei dieser Temperatur im Vergleich zu 25 °C ist. So fanden D'COSTA und CHENG (1983) und TOFFALETTI et al. (1981) auch mit steigender Temperatur einen signifikanten Abfall des ultrafiltrierbaren Calciums.

2.4.2. Interferenzen seitens verschiedener Störionen

Für den klinischen Einsatz der Potentiometrie als Methode zur Bestimmung des ionisierten Calciums war vor allem auch die relativ gute Selektivität der eingesetzten Elektroden mit entscheidend.

Trotz der Entwicklung hochempfindlicher und selektiver Elektroden konnte bis heute die Interferenz durch andere sich im Probengut befindliche Ionen (Störionen, s.S.12) auf die Calciummessung nicht vollständig ausgeschlossen werden (4, 66, 68, 89, 126, 152, 163, 262, 273).

So berichten LADENSON und BOWERS (1973), daß die Variation der normalen Natriumionenkonzentration um $\pm$ 28 $mmol \cdot l^{-1}$ zu einer Fehlmessung des ionisierten Calciums von $\pm$ 4 % führt. Änderungen der Kaliumionenkonzentration von 0 - 7 $mmol \cdot l^{-1}$ blieben ohne deutlichen Effekt auf die Messung des ionisierten Calciums (66, 126, 132).

Über den Effekt von Magnesiumionen auf die Calciumionenbestimmung mittels ionenselektiver Elektrode gibt es widersprüchliche Angaben.
BOINK et al. (1983), FOGH-ANDERSEN (1981), MOORE (1969) und SMITH et al. (1983) fanden, daß pathologisch erhöhte Magnesiumspiegel zu einem fälschlich erhöhten Calciummeßwert füh-

ren. Niedrige Magnesiumspiegel (0 - 1,6 $mmol \cdot l^{-1}$) bleiben ohne Effekt.

LADENSON und BOWERS (1973a) und LI und PIECHOCKI (1971) fanden dagegen einen senkenden Einfluß seitens des Magnesiums auf die Messung des ionisierten Calciums.

Lithium hatte bis zu einer Konzentration von 10 $mmol \cdot l^{-1}$ keinen signifikanten Effekt auf die Calciumionenbestimmung. Neuere Untersuchungen zeigten, daß die Interferenzen seitens Natrium, Kalium, Magnesium, Wasserstoffionen auf den Meßwert des ionisierten Calciums im Vollblut annähernd +0,1 % betragen und daß eine Verdoppelung der Konzentrationen von Natrium, Kalium, Magnesium, Zink und Kupfer über den physiologischen Bereich hinaus zu einem um 12 % höheren Meßwert für das ionisierte Calcium führt (152, 272).

AMMAN et al. (1979) und VADGAMA et al. (1982) berichten, daß mit "neutral carrier" gefüllte Sensoren eine höhere Selektivität aufweisen als mit "bis-dialkyl-phosphat" gefüllte, und daß Veränderungen der Wasserstoff-, Natrium-, Kalium- und Magnesiumionenkonzentration in physiologischen Bereichen ohne signifikanten Effekt auf die Bestimmung des ionisierten Calciums im Blut bleiben.

2.4.3. Interferenzen seitens der Osmolarität

THODE et al. (1982) untersuchten den Effekt einer Erhöhung der Osmolarität im Blut um 100 $mosmol \cdot l^{-1}$ durch Applikation von Glukose oder Carbamid auf die Messung des ionisierten Calciums mittels ionenselektiver Elektroden. Dabei führte die Glukose-Applikation zu einem geringen Anstieg (+0,05 $mmol \cdot l^{-1}$) und die Carbamid-Applikation zu einem geringen Abfall (-0,01 $mmol \cdot l^{-1}$) des Calciumwertes.

2.4.4. Interferenzen seitens der Plasmaproteine

Auf eine mögliche klinisch signifikante Proteininterferenz auf die Messung des ionisierten Calciums mittels ionenselektiver Elektroden wurde von PAYNE (1982) hingewiesen. NIELSEN et al. (1977) untersuchten die Proteininterferenz auf eine Doppel-Membran-Elektrode (Selektrode, ICA1) und fanden, daß die Interferenz seitens des Albumins unter 0,8 % der Konzentration des ionisierten Calciums lag.

FERREIRA und BOLD (1979) berichten, daß das gemessene Calcium in einer nativen Serumprobe 8 % höher lag als in seinem Ultrafiltrat, und daß die Konzentration im proteinreichen Retentat sogar um 17 % höher war. Sie führten diese Unterschiede in den Meßwerten des ionisierten Calciums auf eine mögliche Interferenz seitens der Kolloide an der Elektrode zurück.

Eine lineare Erhöhung der gemessenen Werte des ionisierten Calciums mit steigendem Proteingehalt der Probe ermittelte PAYNE (1982). Der Effekt des Albumins war dabei signifikant höher als der des IgG. So wird ein bei einem Albumingehalt von 40 $g \cdot l^{-1}$ gemessener Wert von 1,14 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Albumingehalt von 20 $g \cdot l^{-1}$ mit 1,09 $mmol \cdot l^{-1}$ ionisiertes Calcium ermittelt und umgekehrt.

2.4.5. Interferenzen seitens der Erythrozyten

Durch SEVERINGHAUS et al. (1956) wurde bereits gezeigt, daß der pH-Wert im Vollblut um ungefähr 0,01 niedriger ist als im Plasma. Als Ursache dieser Differenz wurde der Einfluß von den Erythrozyten auf das "liquid-liquid-junction"-Potential zwischen der gesättigten KCl-Lösung und dem Blut angesehen. Die zwischen Vollblut und Plasma bestehende Differenz steigt auf 0,023 an bei Anhebung der Erythrozytenfraktion auf 0,75. Dies entspricht einem Anstieg des "liquid-junction"-Potentials auf + 1,4 mV (46, 148, 255).

Auch bei der Messung anderer Ionen im Vollblut mittels ionenselektiver Elektroden kommt dieser verfälschende Effekt seitens der Erythrozyten zum Tragen (13, 66, 148, 257, 262, 286). Ein Anstieg des "liquid-junction"-Potentials von 1,4 mV entspricht bei den monovalenten Kationen einer Verfälschung der Aktivität um + 5,4 % und bei den divalenten Kationen um annähernd + 11 %.

So fanden THODE et al. (1982) in Blutproben mit einem Erythrozytenanteil von 0,43 eine Verfälschung um + 5 %. Bei einem Erythrozytenanteil von 0,70 stieg der Verfälschungswert auf + 8 % an. Durch den Einsatz einer gemischten Salzlösung in der Meßbrücke konnte von SIGGAARD-ANDERSEN et al. (1983a) das "liquid-junction"-Potential bis zu einem Erythrozytenanteil von 0,75 auf unter 0,1 mV gehalten werden.

Während FERREIRA und BOLD (1979) bei ihren Messungen des ionisierten Calciums mit dem Orion SS-20-Analyzer noch einen beträchtlichen Effekt seitens der Erythrozyten feststellten, konnten SMITH et al. (1983) bei ihren Untersuchungen mit dem Radiometer ICA1-Analyzer im Hämatokritbereich von 0,15 - 0,78 keinerlei signifikante Verfälschung des Meßwertes erfassen.

2.4.6. Interferenzen seitens Trypsin und Triäthanolamin

Verschiedene Arbeitsgruppen fügten ihren Standardlösungen Trypsin und Triäthanolamin zu in der Annahme, daß dadurch ein Belegen der Elektrodenmembran mit Proteinen verhindert werden kann. Zahlreiche Untersuchungen zeigten jedoch, daß es durch derartige Zusätze in den Standardlösungen zu einer Verfälschung der Messung des ionisierten Calciums in den Proben kommen kann. So führt der Zusatz von Trypsin und Triäthanolamin zu einer deutlichen Abnahme der Konzentration des ionisierten Calciums im Standard (101, 126, 136, 138, 139, 249, 251).

LI und PIECHOCKI (1971) stellten fest, daß die gemessenen Calciumionenwerte in den Serumproben durchschnittlich um 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$ höher waren, wenn Standards ohne Trypsinzusatz verwendet wurden. Ähnliches wurde auch von STUDER et al. (1972) gesehen beim Einsatz von Trypsin- bzw. Triäthanolamin-haltigen Standards. Sie schlugen vor, die gemessenen Werte des ionisierten Calciums in den Blutproben bei Verwendung derartiger Standards zu korrigieren.

2.4.7. Interferenzen seitens der Fließgeschwindigkeit

HANSEN et al. (1977) zeigten, daß das gemessene Potential in den Durchflußelektroden von der Fließgeschwindigkeit abhängig ist. So kam es in wäßrigen Lösungen (Standards) zu einem erniedrigten Potential bei erhöhter Fließgeschwindigkeit. Bei Serumproben bewirkte dagegen eine zunehmende Fließgeschwindigkeit ein abnehmendes Potential bei der Messung des ionisierten Calciums.

2.5. CALCIUMFRAKTIONEN IM LIQUOR CEREBROSPINALIS

ARIEFF und MASSRY (1974) als auch GOLDSTEIN und MASSRY (1979) betonen, daß der Elektrolytgehalt des Gehirns über weite Bereiche durch Schwankungen der ionalen Blutzusammensetzung relativ unbeeinflußt bleibt. Dieses Phänomen wird im Zusammenhang mit einer effizienten Blut-Hirn-Schranke gesehen, zu deren Funktionieren ein wirksamer Ionenaustausch zwischen Liquor cerebrospinalis und Blut, Liquor und Gehirn sowie Blut und Gehirn gehören. Die Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit des Gehirns ist gleich der des Liquor cerebrospinalis.

Die Konzentration des Gesamtcalciums im Liquor ist unter normalen Bedingungen in etwa gleich der des ultrafiltrierbaren Anteils des Calciums im Blut. Von GOLDSTEIN et al. (1979) durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß die Konzentration

des Gesamtcalciums im Liquor 1,16 + 0,06 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Blutcalciumgehalt von 2,29 + 0,08 $mmol \cdot l^{-1}$ betrug und über weite Schwankungsbereiche des Gesamtcalciumgehaltes im Blut relativ konstant blieb. Der Gehalt des diffusiblen Calciums im Blut war dabei gering, jedoch nicht signifikant höher als der Gesamtcalciumgehalt des Liquors. Die Konzentration des ionisierten Calciums betrug im Liquor 0,69 ± 0,06 $mmol \cdot l^{-1}$. Damit lagen hier also 63,7 % des Calciums in ionisierter Form vor. Bei einer extremen Erhöhung des Calciumgehaltes im Blut kam es zu einem geringen, signifikanten Anstieg der Calciumkonzentration im Liquor. Dabei bestand zwischen beiden Calciumkonzentrationen eine enge Korrelation. Der ionisierte Anteil des Calciums im Liquor wurde bei Konzentrationssteigerungen des Calciumgehaltes im Blut auf das Dreifache nur wenig erhöht.

Der relativ geringe prozentuale Anteil des ionisierten Calciums im Liquor mit 64 % im Vergleich zu dem im Ultrafiltrat mit durchschnittlich 84 % wurde auf die relativ hohen Konzentrationen von Laktat (1,87 $mmol \cdot l^{-1}$) und Citrat (0,29 $mmol \cdot l^{-1}$) im Liquor gegenüber dem Blut (0,99 bzw. 0,13 $mmol \cdot l^{-1}$) bezogen. Durch die Proteine (0,39 $g \cdot l^{-1}$) können im Liquor nur ungefähr 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ des Calciums gebunden werden.

Das Verhältnis des ionisierten Calciums vom Liquor zum Serum betrug bei GOLDSTEIN et al. (1979) 0,67 und bei MOORE und BLUM (1968) 0,73.

FUCHS (1974) untersuchte das Verhalten der Calciumfraktionen im Serum und Liquor cerebrospinalis vor und nach Hyperventilation. Dabei fiel bei allen Patienten das ionisierte Calcium von durchschnittlich 1,135 auf 1,075 $mmol \cdot l^{-1}$ bei nahezu konstantem Gesamtcalciumgehalt (2,285 bzw. 2,275 $mmol \cdot l^{-1}$) im Serum ab. Der prozentuale Anteil des ionisierten Calciums sank dabei von 49,7 auf 47,3 %. Bei abfallendem pCO_2 kam es zu einem begleitenden pH-Anstieg.

Im Liquor blieb die Konzentration des ionisierten Calciums während der Hyperventilation bei allen Patienten konstant (0,83 bzw. 0,825 $mmol \cdot l^{-1}$). Ebenso unverändert waren der Gesamtcalciumgehalt von $1,14 \pm 0,07$ $mmol \cdot l^{-1}$ und damit auch der prozentuale Anteil der Ionisation. Im Säure-Basen-Status des Liquors kam es durch die Hyperventilation jedoch zu Verschiebungen. So stieg der pH-Wert von durchschnittlich 7,338 auf 7,366 und der pCO_2 fiel von 46,4 auf 44,8 mm Hg ab. Das Standardbikarbonat erhöhte sich von 23,05 auf 23,90 $mmol \cdot l^{-1}$. FUCHS (1974) berechnete aus diesen Untersuchungsergebnissen einen Liquor-Serum-Quotienten von 0,73 vor und von 0,77 im Verlauf der Hyperventilation.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. METHODEN

3.1.1. Arten der Probengewinnung und Probenbehandlung

3.1.1.1. Standardisierte Blutentnahme

Auf die Notwendigkeit einer Blutentnahme unter Standardbedingungen für die Festlegung von Referenzbereichen ist in verschiedenen Arbeiten hingewiesen worden (z.B. JUNGE et al. 1978).

So erfolgte die Blutentnahme am liegenden und nüchternen (12-stündige Nahrungskarenz) Patienten zwischen 8 und 9 Uhr morgens bei einer Umgebungstemperatur von 18 bis 25° C. Die Blutentnahme geschah aus einer Cubitalvene des Armes. Zum Einstechen einer genügend großen Kanüle (Sterican^{R}, 1,10 x 30 mm / 19 G x 1, ^{1}/4) wurde nur kurz (maximal 10 - 15 Sekunden) gestaut. Danach wurde das Blut in heparinisierte Spritzen oder Vacutainer^{R} zur Vollblut- und Plasmagewinnung bzw. in nicht heparinisierte Vacutainer^{R} zur Serumgewinnung aufgenommen.

Zur Einhaltung anaerober Kautelen bei der Probennahme wurde auf eine vollständige Füllung der Vacutainer^{R} und eine luftblasenfreie Füllung der Einmalspritzen geachtet. Unmittelbar nach der Probennahme wurden die Spritzen mit einem Gummistopfen verschlossen.

Die Blutentnahme aus den verschiedenen Regionen des Kreislaufes (V. cava caudalis, Aorta abdominalis, A. pulmonalis, linker Ventrikel) erfolgte während der Herzkatheteruntersuchung in Judkins-Technik in heparinisierte Einmalspritzen.

3.1.1.2. Blutentnahme zur Überprüfung der Zuverlässigkeit

Bei diesem Vorgehen wurde von neu aufgenommenen Patienten ohne Störung der Calcium-Homeostase im Routinebetrieb das ionisierte Calcium bestimmt. Die Blutentnahme wurde dabei durch unterschiedliches Personal vorgenommen.

3.1.1.3. Blutentnahme bei Stauung mit und ohne Bewegung der gestauten Extremität

Bei diesen Untersuchungen hinsichtlich des Effektes der Stauung auf das Verhalten des ionisierten Calciums, des Gesamtcalciums, des Gesamtproteins und der Wasserstoffionenkonzentration wurde der Arm mit einem Druck von 100 mm Hg über eine Dauer von 3 Minuten mittels Blutdruckmanschette gestaut. Beginn und Ende der Stauung erfolgten rasch. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor Beginn, unmittelbar nach sowie der ersten, dritten und siebenten Minute der Beendigung der Stauung. Verglichen wurde ebenfalls der Effekt einer Stauung mit zusätzlicher gleichzeitiger aktiver Bewegung der gestauten Extremität. Dabei wurde ein Dynamometer mit 20 - 30 % der maximalen individuellen Spannung mit einer Frequenz von 8 - 10 min^{-1} betätigt. Die Sequenz der Blutentnahme war identisch.

3.1.1.4. Blutentnahme vor und nach Hyperventilation

Während der Herzkatheteruntersuchung wurde der Patient aufgefordert, die Ventilation über 3 Minuten zu forcieren. Vor und nach der Hyperventilation wurden Proben aus dem arteriellen und venösen Schenkel des Kreislaufes gewonnen.

3.1.1.5. Blutentnahme zur Untersuchung des Heparineffektes

Zur Festlegung der optimalen Heparinisierung der Vollblutproben zur Analyse des ionisierten Calciums führten wir auch Untersuchungen zum Effekt verschiedener Heparinkonzentrationen durch.

Die Heparinkonzentrationen schwankten dabei zwischen 5 und 250 I.E. ml^{-1} Blut. Eingesetzt wurden Liquemin^{R} (Hoffmann-La Roche AG) und S 4500 Heparin (Radiometer). Die Bestimmung der Normwertbereiche erfolgte mit 10 I.E. ml^{-1} Blut, wobei das Heparin zur Wahrung der anaeroben Verhältnisse in

einer 0,9%igen NaCl-Lösung verdünnt und damit der Totraum der Einmalspritzen gefüllt wurde.

3.1.1.6. Transport und Lagerung der Blutproben

Die gefüllten und verschlossenen Spritzen oder Vacutainer^{R} wurden unmittelbar nach der Entnahme in mit Eis gefüllte Behälter gegeben, in diesen transportiert und bis zur Analyse aufbewahrt. Die durchschnittliche Lagerungsdauer betrug 30 - 60 Minuten.

Bei den Untersuchungen hinsichtlich des Verhaltens der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (4 bzw. 21° C) und der Lagerungsdauer wurden auch Analysen nach 2, 4, 8 und 24 Stunden durchgeführt.

3.1.1.7. Anaerobe Plasmagewinnung

Zur Vermeidung von CC_2-Verlusten und damit Verschiebung des pH-Wertes wurden die Proben zur Plasmagewinnung in nachevakuierte, silikonisierte und mit entsprechenden Heparinmengen versehene Vacutainer^{R} aufgefangen oder das bereits in den Einmalspritzen gewonnene heparinisierte Blut in nicht heparinisierte Vacutainer^{R} gegeben.

Die Vacutainer^{R} wurden ebenfalls bei 4° C gelagert und unmittelbar vor der Analyse zentrifugiert. Das Plasma wurde zur Analyse mit Hilfe einer Kanüle in eine Spritze aufgezogen.

3.1.1.8. Anaerobe Serumgewinnung

Hier erfolgte die Probennahme in nachevakuierten, nicht heparinisierten Vacutainer^{R} direkt. Auch diese vollständig gefüllten Vacutainer^{R} wurden bei 4° C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben zentrifugiert. Die Seren wurden dann durch den Gummistopfen aus dem Vacutainer^{R} mit Hilfe einer Kanüle in eine Spritze aufgezogen, deren Tot-

raum mit Stickstoff bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt war.

3.1.1.9. Tonometrie

Die Äquilibrierung der Blutproben zur Bestimmung der Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von der Wasserstoffionenkonzentration ($lgcCa^{++}$ / pH) unter in vitro-Bedingungen erfolgte mittels Tonometer IL 237 (Fa. Instrumentation Laboratory GmbH, Hersel). Bei diesem Gerät sind sowohl der Gasbefeuchter als auch das Äquilibrierungsgefäß von einem temperierten Wasserbad umschlossen. Durch Wasserdampfsättigung des verwendeten Gasgemisches bei 37° C wird eine Probeneindickung während des Äquilibrierungsvorganges weitgehend vermieden.

Eine diskontinuierliche Rotation des Probenbehälters schafft eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Äquilibrierungsgas und Blutprobe. Dadurch wird die Zeitdauer bis zur Einstellung eines steady state wesentlich verkürzt.

Die Zeitdauer des Äquilibrierungsvorganges kann variiert werden. Wir wählten Zeiten zwischen 1 und 7,5 Minuten. Als Äquilibrierungsgas dienten uns Eichgase der Fa. Linde mit einem Kohlendioxidgehalt von 3,0 und 7,1 Vol. % bei einem Rest Sauerstoff mit 97,0 und 92,9 Vol. %.

Die Probenmenge betrug jeweils 2 ml Vollblut und der Gasstrom 350 - 400 $ml \cdot min^{-1}$. Die Temperatur des Wasserbades wurde auf 37° C einreguliert.

3.1.2. Lumbalflüssigkeitsentnahme

Der Liquor cerebrospinalis wurde durch Einstich in den Rükkenmarkskanal zwischen dem 3. und 4. Lendenwirbel am nüchternen Patienten vorgenommen. Der Liquor wurde in 2 ml Einmalspritzen unter Einhaltung anaerober Kautelen aufgefangen und bei 4° C bis zur Analyse aufbewahrt.

3.1.3. Normwertbestimmungen

In einem Zeitraum von 2 Monaten wurden bei 80 Probanden (50 männlich und 30 weiblich, Durchschnittsalter 28 Jahre), bei denen keinerlei Calcium-Stoffwechselstörungen bekannt waren, die Normwertbereiche für das Gesamtcalcium und das ionisierte Calcium im Blut bestimmt.

Die Bestimmung des Gesamtcalciums und ionisierten Calciums im Liquor erfolgte bei 12 Patienten (fünf männlich, sieben weiblich, Durchschnittsalter 41 Jahre), bei denen ebenfalls keine Calcium-Stoffwechselstörung vorlag, im Rahmen neurologischer Diagnostik. Der Liquor cerebrospinalis wies auch keine anderen pathologischen Veränderungen auf.

3.1.4. Arten der Probenanalyse

3.1.4.1. Bestimmung des Säure-Basen-Status

Die Analyse des Säure-Basen- und Blutgas-Status im Vollblut erfolgte mittels der Analyzer (AVL 940 der Fa. AVL, Graz, Österreich; IL 1303 der Fa. Instrumentation Laboratory GmbH, Hersel, Deutschland; ABL 30 der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Die eingesetzten Analyzer sind vollautomatische Meßgeräte für die routinemäßige in vitro-Bestimmung des Säure-Basen- und Blutgas-Status im Vollblut, Plasma oder Serum. Durch integrierte Eichstandards und Eichgase erfolgt eine automatische Standardisierung der verschiedenen Elektrodensysteme (pH, pCO_2, pO_2). Die Analyse der Proben läuft unter streng anaeroben Bedingungen ab.

Die Qualitätskontrolle erfolgte täglich vor und nach den Versuchsserien durch Analyse von Standards (Contrill^R - Fa. IL; Quantra^R Plus - Fa. American-Dade; Blood Gas Qualicheck^R - Fa. Radiometer).

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit führten wir auch Vergleichsmessungen in einer Blutprobe mit den verschiedenen Geräten in unterschiedlichem Abstand durch.

Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse mehrerer Vergleichsmessungen bei Mehrfachbestimmungen (jeweils 20 Analysen) verschiedener Blutproben im Verlauf der vorliegenden Studie.

Tab. 1: Ergebnisse von jeweils 20 Vergleichsmessungen verschiedener Blutproben mit dem Analyzer AVL 940, ABL 30 und dem IL 1303 ($n = 4 \times 20$; $\bar{X} \pm SD$).

	AVL 940	IL 1303	ABL 30
pH	7,37 + 0,012	7,34 + 0,010	7,35 + 0,013
pCO_2	46,73 + 1,025	47,46 + 1,287	47,21 + 1,321 mm Hg

3.1.4.2. Bestimmung des Gesamtcalciums

Die Bestimmung des Gesamtcalciumgehaltes im Serum oder Plasma wurde mittels Atomabsorptionsspektrometer (AAS PERKIN ELMER 380 der Fa. Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) durchgeführt.

Die Eichung des Gerätes erfolgte mittels Lösungen, die die mengenmäßig wichtigsten Elektrolyte in physiologsicher Konzentration enthielten (Na 143,5 $mmol \cdot l^{-1}$; K 3,84 $mmol \cdot l^{-1}$; Mg 0,82 $mmol \cdot l^{-1}$; Ca 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$).

Vor Beginn der Analysen wurde das Atomabsorptionsspektrometer mit 1 : 51 Verdünnungen (100 µl Standard + 5,0 ml Verdünnungslösung) des Standards geeicht. Da in diesem Bereich der Messung die Extinktionskurve nahezu linear verläuft, konnte nach einer Zweipunkteichung (Ansaugen von Luft zur Bestimmung des Nullpunktes und Festlegung des 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$-Wertes mit der Eichlösung) die Messung mit 1 : 51-Verdünnungen der Plasma- oder Serumproben durchgeführt werden. Als Verdünnungslösung wurde eine Strontiumchlorid-Lösung ($SrCl_2$ 0,25-%ig) mit 6 % Butanol eingesetzt, um chemische Anioneninterferenzen mit Phosphaten und Sulfaten in der Serum- oder Plasmaprobe zu verhindern (PASCHEN und FRITZ 1970, WILLIS 1960).

Technische Daten des Modells PERKIN-ELMER 380

Analysenwellenlänge	422,7 nm
Monochromator-Spaltbreite	2,0 nm
Lampenstrom der Hohlkathodenlampe	15,0 mA
Lichtstrahl der Hohlkathodenlampe	40- 50 mm
Brenngas: Acetylen	0,9 bar
Oxidans: Preßluft	0,5 bar
Brenner: Dreischlitz-Brennerkopf	
Anzeige: Digitale Meßwertanzeige mit Einstellzeit unter 10 Sekunden	

Zur Prüfung der Methode auf Präzision wurden handelsübliche Standardseren verwendet.

Es wurden jeweils 20 Serumverdünnungen angesetzt und analysiert. Die Ergebnisse der Präzisionskontrollen sind in der Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab. 2: Ergebnisse von jeweils 20 Vergleichsmessungen verschiedener Standardseren mit dem AAS PERKIN-ELMER 380 (n = 12 x 20; X + SD, V%)

n	$\bar{X}$ $mmol \cdot l^{-1}$	SD $mmol \cdot l^{-1}$	V %	Sollwert $mmol \cdot l^{-1}$
240	2.40	0,01	0,42	2,40

Auf die hohe Spezifität und Richtigkeit der Atomabsorptionsspektrometrie bei der Bestimmung des Gesamtcalciums im Serum oder Plasma bei dem oben beschriebenen Vorgehen wurde bereits mehrfach hingewiesen (PASCHEN 1975, PASCHEN und FRITZ 1970).

3.1.4.3. Bestimmung des ionisierten Calciums

Die Bestimmung des ionisierten Calciums erfolgte mittels ionenselektiver Elektroden. Eingesetzt wurden verschiedene Calcium-Durchfluß-Meßsysteme (AVL 980 - Fa. AVL, Graz, Österreich; Orion SS-20, Orion, Cambridge/Mass., USA; NOVA 2 und NOVA 8 - Fa. NOVA biomedical, Newton USA; ICA1 - Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

Dies sind halb- oder vollautomatische Meßgeräte für die routinemäßige "in vitro"-Bestimmung des ionisierten Calciums im Vollblut, Plasma oder Serum. Durch integrierte Eichstandards erfolgt eine automatische Standardisierung. Die Analyse geschieht unter streng anaeroben Bedingungen. Nach abgeschlossener Analyse reinigen sich die Systeme selbst.

Technische Daten des Modells ORION SS-20

Elektrode	ionenselektiv für Calcium
Meßbereich	0,25 - 5,0 $mmol \cdot l^{-1}$
Ablesegenauigkeit	0,005 $mmol \cdot l^{-1}$
Reproduzierbarkeit	Standardabweichung 2 % vom Meßwert
Relative Genauigkeit	± (0,01 $mmol \cdot l^{-1}$ + 1 % der Ablesung)
Elektrodenthermostatisierung	36 bis 38° C, Genauigkeit + 0,1° C
Haltbarkeit	ca. 3 Monate
Meßzeit	ca. 3 Minuten
Probenvolumen	0,5 ml Vollblut, Plasma oder Serum

Modell AVL 980

Elektrode	ionenselektiv für Calcium
Meßbereich	0,1 - 10 $mmol \cdot l^{-1}$
Ablesegenauigkeit	0,01 $mmol \cdot l^{-1}$
Reproduzierbarkeit	Standardabweichung 1 % vom Meßwert
Relative Genauigkeit	± 1 % der Anzeige
Elektrodenthermostatisierung	keine, Raumtemperatur

Haltbarkeit	ca. 3 Monate
Meßzeit	1,5 Minuten
Probenvolumen	0,08 ml mit Spritze oder Mikropipette 0,06 ml mit Glaskapillare

Modell NOVA 2

Elektrode	ionenselektiv für Calcium
Meßbereich	0,1 - 10 $mmol \cdot l^{-1}$
Ablesegenauigkeit	0,01 $mmol \cdot l^{-1}$
Reproduzierbarkeit	Standardabweichung < 1 % vom Meßwert
Relative Genauigkeit	± 1 % der Ablesung
Elektrodenthermo-statisierung	37° C ± 0,1° C
Haltbarkeit	ca. 3 Monate
Meßzeit	75 Sekunden
Probenvolumen	<0,350 ml Vollblut, Pasma oder Serum

Der halbautomatische (ICA1) und der vollautomatische Calciumionen-Analyzer NOVA 8 haben gleichzeitig eine pH-Meßkette integriert. Neben der direkten potentiometrischen Messung von pH und ionisiertem Calcium wird das auf einen pH-Wert von 7,4 korrigierte ionisierte Calcium über ein Rechenprogramm nach der folgenden Formel ermittelt:

$$cCa^{++}\ (pH=7,4) = cCa^{++}\ [1 - 0,53\ (7,4 - pH)]$$

Modell ICA1

Elektrode	ionenselektiv für Calcium (Doppelmembran Selektrode)
Meßbereich	0,20 - 5,00 $mmol \cdot l^{-1}$
Ablesegenauigkeit	0,01 $mmol \cdot l^{-1}$
Reproduzierbarkeit	Standardabweichung 1% vom Meßwert
Relative Genauigkeit	± 1 % der Anzeige
Elektrodenthermo-statisierung	37° C ± 0,1° C
Haltbarkeit	ca. 3 Monate

Meßzeit	ca. 1,5 Minuten
Probenvolumen	0,125 ml Vollblut, Plasma oder Serum
Meßbereich pH	6,00 - 8,80
Meßbereich cCa^{++} pH 7,4	0,18 - 5,53 $mmol \cdot l^{-1}$

Modell NOVA 8

Elektrode	ionenselektiv für Calcium
Meßbereich	0,1 - 10 $mmol \cdot l^{-1}$
Ablesegenauigkeit	0,01 $mmol \cdot l^{-1}$
Reproduzierbarkeit	Standardabweichung 1 % vom Meßwert
Relative Genauigkeit	± 1 % der Ablesung
Elektrodenthermostatisierung	37° C ± 0,1° C
Haltbarkeit	ca. 3 Monate
Meßzeit	75 Sekunden
Probenvolumen	0,300 ml Vollbut, Plasma oder Serum

3.1.5. Arten der statistischen Auswertung der Resultate

Zur statistischen Qualitätskontrolle, zur Ermittlung des Vertrauensbereiches, der Abhängigkeit zwischen den Variablen und der Signifikanz wurden gängige statistische Rechenverfahren eingesetzt (IMMICH 1974).

Für die Entscheidung, ob zwischen zwei Stichproben bestehende Unterschiede rein zufällig oder signifikant sind, wurde die statistische Analyse mit dem t-Test nach Student mit dem Signifikanzniveau $p = <0,05 - 0,01$ (+) und $p = <0,005 - 0,001$ (++) durchgeführt.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von dem eingesetzten Analyzer mit ionenselektiven Elektroden

Ionenselektive Elektroden zur Bestimmung des ionisierten Calciums im Blut sind seit über 10 Jahren im klinischen Labor im Einsatz. Heute stehen bereits verschiedene halb- oder vollautomatische Analysegeräte für den Dauereinsatz zur Verfügung.

Bei der Bestimmung des ionisierten Calciums sind dabei Untersuchungen zur Qualitätskontrolle nur teilweise möglich. So können Zugabe-Analysen im Plasma oder Vollblut nicht durchgeführt werden. Referenzmethoden, die der potentiometrischen Analyse gleichwertig oder gar überlegen sind, gibt es nicht (s. S. 7 - 16). Auch ausreichend definierte Kontroll- und Normalseren waren für die Calciumionenbestimmung bisher nicht verfügbar (FUCHS 1981).

Angaben über unterschiedliche Charakteristika der eingesetzten ionenselektiven Membranen sowie über teilweise recht divergierende Normbereiche veranlaßten uns, Vergleichsmessungen mit verschiedenen Analysesystemen (ORION SS-20, AVL 980, NOVA 2, NOVA 8 und ICA1) durchzuführen.

Die Analysen wurden dabei in verschiedenen Medien (wäßrige Standards, Serum, Vollblut) durchgeführt, um so auch möglicherweise auftretende Interferenzen seitens verschiedener Bestandteile (Plasmaproteine, Erythrozyten) besser erfassen zu können.

Die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Calciumionenbestimmung in Standards, Poolseren und Vollblut (letztere nur in Serie) sind in den Tabellen 3-7 im Vergleich aufgezeigt.

Tab. 3: Reproduzierbarkeit der Calciumionenbestimmung mit den verschiedenen Analyzern in wäßrigen Standards
(Ca^{++} in $mmol \cdot l^{-1}$; n = 4 x 20; $\bar{X} \pm SD$)

Standard	SS-20	AVL 980	NOVA 2	NOVA 8	ICA1
2,50	2,48 ± 0,020	2,40 ± 0,020	2,52 ± 0,010	2,50 ± 0,003	2,50 ± 0,009
1,50	1,47 + 0,020	1,44 ± 0,020	1,51 ± 0,010	1,50 ± 0,004	1,50 ± 0,005
1,00	1,01 ± 0,010	1,00 ± 0,010	0,99 ± 0,010	1,00 ± 0,003	1,00 ± 0,004
0,50	0,52 ± 0,010	0,52 + 0,010	0,49 ± 0,010	0,50 ± 0,004	0,50 ± 0,006

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, zeigten alle Ca^{++}-Analyzer bei der Messung wäßriger Standards eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten von unter 1 % in der Serie.

Die größten Variationskoeffizienten wurden bei der Analyse von Standards mit einem Gehalt an ionisiertem Calcium von 1,50 und 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$ mit dem AVL 980 und dem ORION SS-20 erhalten.

Der mit dem AVL 980 erzielte Meßwert von 2,40 ± 0,02 bei einem Sollwert von 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$ war signifikant ($p \leq 0,001$) erniedrigt. Die anderen Meßwerte waren bei den einzelnen Analysegeräten nicht signifikant unterschiedlich.

Seit kurzem befinden sich auf dem Markt Analyseeinheiten (NOVA 8, ICA1) zur Messung des ionisierten Calciums mit integrierter pH-Messung und Kalkulation der Konzentration des ionisierten Calciums auf einen pH-Wert von 7,40. Bei der Analyse wäßriger Standards wurden die in der Tabelle 4 angegebenen Werte der Reproduzierbarkeit für die aktuelle Calciumionenkonzentration, den pH und die auf pH 7,4 korrigierte Calciumionenkonzentration erhalten.

Tab. 4: Reproduzierbarkeit der Calciumionen- und pH-Wertbestimmung mit dem Ca^{++}-Analyzer NOVA 8 und ICA1 ($n = 2 \times 20$; $\bar{X} \pm SD$)

Standard		NOVA 8	ICA1	
Ca^{++} aktuell	1,50	1,50 ± 0,005	1,50 ± 0,012	$mmol \cdot l^{-1}$
pH	7,27	7,27 ± 0,011	7,26 ± 0,008	
Ca^{++} pH 7,4		1,39 ± 0,010	1,38 ± 0,011	$mmol \cdot l^{-1}$
Ca^{++} aktuell	1,00	1,00 ± 0,004	1,00 ± 0,005	$mmol \cdot l^{-1}$
pH	7,45	7,45 ± 0,015	7,45 ± 0,011	
Ca^{++} pH 7,4		1,03 ± 0,010	1,03 ± 0,010	$mmol \cdot l^{-1}$

Aus den Angaben der Tabelle 4 ist eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Messungen von ionisiertem Calcium und pH bei der Analyse wäßriger Standards mit den Systemen NOVA 8 und ICA1 zu erkennen. Der Variationskoeffizient lag bei diesen Meßserien deutlich unter 1 %.

Mit den Ca^{++}-Analyzern ORION SS-20, AVL 980 und NOVA 2 wurden auch Vergleichsmessungen in Poolseren in Serie und an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Reproduzierbarkeit der Calciumionenbestimmung in Poolseren mit den verschiedenen Analyzern ($n = 2 \times 20$; $\bar{X} \pm SD$)

Serum	SS-20	AVL 980	NOVA 2
in Serie	1,20 ± 0,008	1,18 ± 0,010	1,22 ± 0,009 $mmol \cdot l^{-1}$
Tag zu Tag	1,18 ± 0,019	1,16 ± 0,021	1,21 ± 0,016 $mmol \cdot l^{-1}$

Auch die Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums in den Poolseren zeigte eine relativ gute Übereinstimmung der mit den verschiedenen Analyzern ermittelten Meßwer-

te. Die geringen Unterschiede in der mittleren Konzentration des ionisierten Calciums waren dabei nicht signifikant. Der Variationskoeffizient lag in der Serie zwischen 0,7 und 0,8 % und von Tag zu Tag zwischen 1,3 und 1,8 %.

Bei der Messung des ionisierten Calciums in Vollblutproben, wo Messungen der Reproduzierbarkeit nur in Serie möglich sind, wurden mit den Analyzern ORION SS-20, AVL 980 und NOVA 2 sowie dem NOVA 8 und dem ICA1 die in den Tabellen 6 und 7 aufgezeigten Vergleichswerte erhalten.

Tab. 6: Reproduzierbarkeit der Calciumionenbestimmung in einer Vollblutprobe in Serie mit verschiedenen Analyzern ($n = 2 \times 20$; $\bar{X} \pm SD$).

Vollblut	SS-20	AVL 980	NOVA 2
in Serie	1,17 + 0,011	1,19 + 0,018	1,24 + 0,011 mmol l^{-1}

Wie aus der Tabelle 6 zu ersehen ist, lagen die mit dem NOVA 2 gemessenen Werte der Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut signifikant über den mit dem AVL 980 ($p \leqq 0,01$) und den mit dem ORION SS-20 ($p \leqq 0,001$) ermittelten. Die Variationskoeffizienten betrugen dabei 1,0, 1,1 bzw. 0,9 %.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen der aktuellen Calciumionenkonzentration und des pH-Wertes mit dem NOVA 8 und dem ICA1 im Vollblut zeigte eine ausgezeichnete Übereinstimmung der in Serie ermittelten Meßwerte bei einem Variationskoeffizienten unter 1 %.

Tab. 7: Reproduzierbarkeit der Messungen in einer Vollblutprobe mit dem NOVA 8- und ICA1-Analyzer
($n = 2 \times 20$; $\bar{X} \pm SD$)

Vollbut		NOVA 8	ICA1	
Ca^{++}	aktuell	1,18+0,006	1,18 +0,004	$mmol \cdot l^{-1}$
pH		7,29+0,008	7,28+0,005	
Ca^{++}	pH 7,4	1,11+0,011	1,11+0,007	$mmol \cdot l^{-1}$

Bei dem Einsatz der Ca^{++}-Analyzer NOVA 8 und ICA1 in der klinischen Routine wurden mit beiden Geräten sehr gut übereinstimmende Meßwerte ermittelt (Tabelle 8, Abbildungen 2, 3, 4).

Tab. 8: Konzentration des ionisierten Calciums und der pH im venösen Blut bei 60 Patienten ohne Störung der Calciumhomeostase.
Ges.Ca = 2,36+0,08 $mmol \cdot l^{-1}$ ($\bar{X} \pm SD$)

		NOVA 8	ICA1
Ca^{++}	aktuell	1,13 + 0,09	1,14 + 0,10 $mmol \cdot l^{-1}$
pH		7,38 + 0,07	7,38 + 0,08
Ca^{++}	pH 7,4	1,12 + 0,09	1,13 + 0,10 $mmol \cdot l^{-1}$

Auffällig ist hier neben der guten Übereinstimmung der erzielten Meßwerte deren relativ große Streubreite.

Als Ursache der im klinischen Routinebetrieb festgestellten inter- und intraindividuell relativ großen Schwankungsbreite der Meßwerte des ionisierten Calciums konnte eine nicht immer ausreichende Einhaltung der standardisierten Blutentnahme (s. S. 49) ermittelt werden.

Dieser Umstand veranlaßte uns, Untersuchungen über den Effekt einer Antikoagulation mit Heparin, einer Probenlagerung

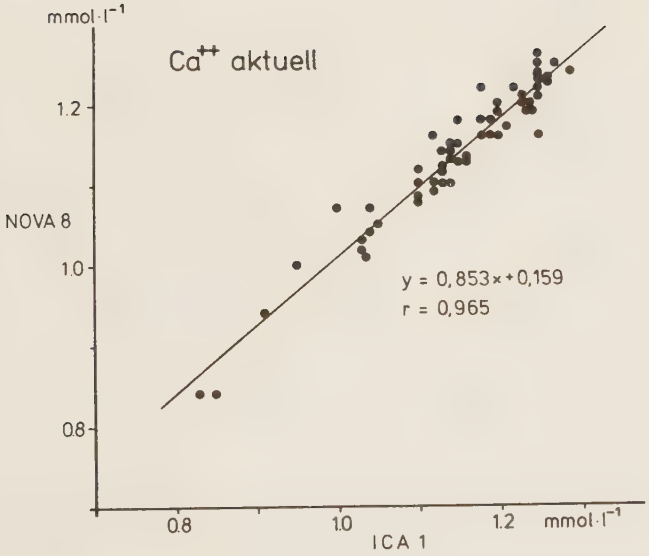

Abb. 2: Korrelation zwischen den Konzentrationen des ionisierten Calciums in 60 Vollblutproben bei der Bestimmung mit dem NOVA 8 und dem ICA 1.

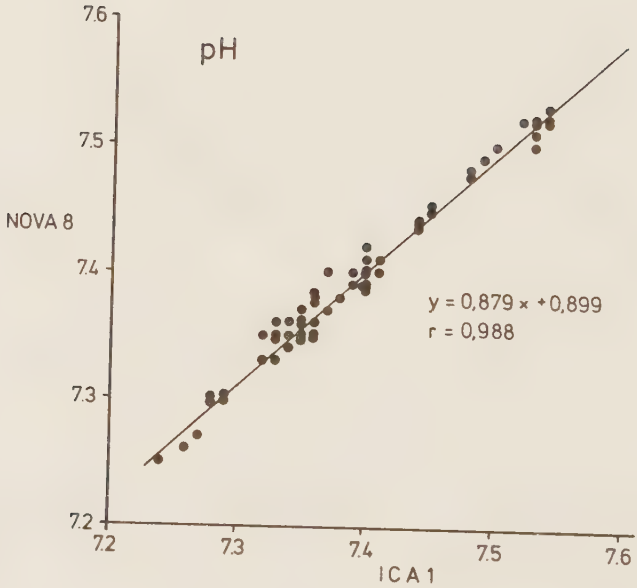

Abb. 3: Korrelation zwischen den pH-Werten in 60 Vollblutproben bei der Bestimmung mit dem NOVA 8 und dem ICA 1.

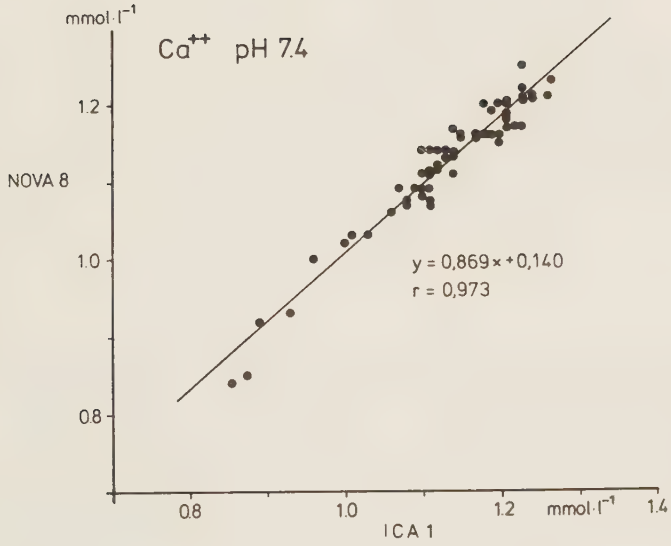

Abb. 4: Korrelation zwischen den Konzentrationen des auf einen pH-Wert von 7,4 korrigierten ionisierten Calciums in 60 Vollblutproben bei der Bestimmung mit dem NOVA 8 und dem ICA 1.

bei unterschiedlicher Umgebungstemperatur und der Venostase vor der Probennahme auf die Konzentration des ionisierten Calciums im Blut detailliert durcnzuführen.

3.2.2. Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von verschiedenen präanalytischen Faktoren

3.2.2.1. Einfluß der Antikoagulation der Proben mit verschiedenen Heparinkonzentrationen

Zur Vermeidung von Systemverstopfungen bei der direkten Messung der Konzentration des ionisierten Calciums mit Durchflußelektroden ist eine Antikoagulation unumgänglich. Wegen der starken Neigung verschiedener Antikoagulantien (EDTA; Citrat, Oxalat), mit den Calciumionen Komplexe zu bilden und somit den Meßwert zu verfälschen, wird für die Analyse des ionisierten Calciums Heparin als Mittel der Wahl empfohlen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über den Effekt steigender Heparinkonzentrationen (10 bis 250 I.E. ml^{-1} Blut) auf die Konzentration des ionisierten Calciums sind in der Abbildung 5 dargestellt.

Aus der Abbildung 5 ist zu erkennen, daß Heparin (Liquemin^{R}) in konzentrationsabhängiger Weise zu einem signifikanten Abfall der Calciumionenkonzentration im Vollblut führt. So fällt die Konzentration des ionisierten Calciums von durchschnittlich $1{,}17 \pm 0{,}03$ $mmol \cdot l^{-1}$ bei 10 I.E. Heparin pro ml Blut um 9 % bei 100 I.E. und um durchschnittlich 23 % bei 250 I.E. signifikant ($p \leq 0{,}001$) ab. Der pH-Wert der Proben bleibt durch die steigenden Heparin-Zusätze unbeeinflußt.

Geringere Heparin-Konzentrationen (unter 10 I.E.) hatten ebenfalls bereits einen senkenden, jedoch nicht signifikanten Effekt auf die Konzentration des freien Calciums, bargen aber die Gefahr der unvollständigen Antikoagulation und damit der Systemverstopfung.

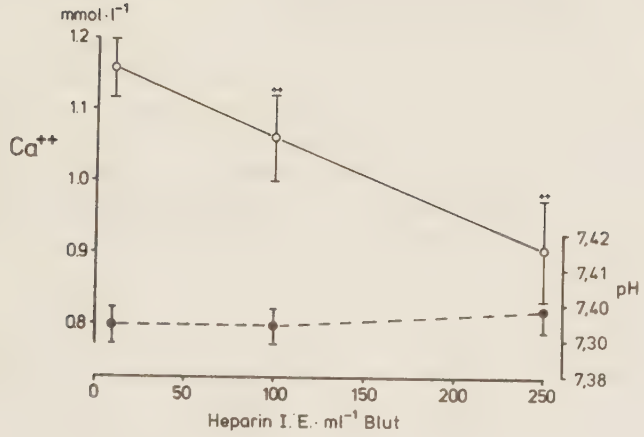

Abb. 5: Die Konzentration des ionisierten Calciums und der pH-Wert im Vollblut. Einfluß von Heparin (Liquemin^{R}-Roche) in steigender Konzentration (n = 20; $\bar{X} \pm SD$) (++ = $p \leq 0{,}001$).

Die Konzentration des Gesamtcalciums wurde durch das Heparin bis zu einer Konzentration von 250 I.E. je ml Blut nicht nachweisbar verändert.

Nachdem der durch Heparin bedingte Effekt auf die Konzentration der Calciumionen im Blut seit langem in etwa bekannt ist, bietet die Fa. Radiometer ein "HEPARIN for Ionized Calcium Analyses" an, dem $CaCl_2$ ($3 \cdot 10^{-6}$ mol·ml^{-1}) zugesetzt wurde mit dem Ziel, die durch Heparin bedingte Komplex-Bildung mit dem Calcium dadurch auszugleichen. Bei einem Vergleich des $CaCl_2$-substituierten Heparins mit normalem Heparin in den Konzentrationen von 20 und 100 I.E. je ml Blut wurden die in der Tabelle 9 aufgezeigten Resultate erhalten.

Tab. 9: Die Konzentration des ionisierten Calciums und der pH-Wert in Blutproben mit verschiedenen Heparin-Konzentrationen mit (+) und ohne $CaCl_2$-Addition (o)
(n = 20; $\bar{X} \pm SD$)

Heparin I.E.ml^{-1}	20 °	100 °	20 $^+$	100 $^+$
Ca^{++} aktuell	1,154 ± 0,047	1,062 ± 0,059	1,215 ± 0,044	1,203 ± 0,061
pH	7,401 ± 0,049	7,399 ± 0,032	7,399 ± 0,032	7,402 ± 0,036
Ca^{++} pH 7,4	1,155 ± 0,041	1,063 ± 0,052	1,215 ± 0,030	1,204 ± 0,053

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen nochmals deutlich den verfälschenden Effekt seitens des Heparins auf die gemessene Konzentration des ionisierten Calciums. Dieser konzentrationsabhängige signifikante Einfluß des Heparins auf die Konzentration des ionisierten Calciums kann durch die Applikation von Calcium zum Heparin in einer dem Plasmagehalt adäquaten Konzentration aufgehoben werden. Der Gesamtcalciumgehalt, die Konzentration des ionisierten Calciums und der pH-Wert der Probe erfahren durch die $CaCl_2$-Substitution des Heparins keine meßbaren Verfälschungen.

3.2.2.2. Einfluß der Probenlagerung unter verschiedenen Temperaturbedingungen

Eine weitere Fehlerquelle bei der Bestimmung des ionisierten Calciums im Blut stellt die unterschiedliche Behandlung der Proben von der Abnahme bis zur Analyse dar.

Die Frage der optimalen Lagerungstechnik und des maximalen Lagerungszeitraumes zur Wahrung der Ausgangsbedingungen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich beantwortet.

Da es bei einer Fehlfunktion des Analyzers bzw. bei der Entnahme von einer größeren Anzahl Proben zu längeren Zeiträumen zwischen der Entnahme und der Analyse kommt, ist besonders bei der Vollblutbestimmung die Frage nach optimalen

und praxisnahen Lagerungsbedingungen unumgänglich. So untersuchten wir das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums, des pH und des pCO_2 in Vollblutproben bei Lagerungstemperaturen von 4 und 21°C im Verlaufe von 24 Stunden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 6 dargestellt.

Der Säure-Basen-Status wurde miterfaßt, um mögliche Wechselbeziehungen zur Konzentration des ionisierten Calciums während der Lagerung besser abschätzen zu können.

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß es in der Konzentration des ionisierten Calciums bei 4°C Lagerungstemperatur in den Blutproben im Verlauf von 8 Stunden zu keinen signifikanten Veränderungen bei weitgehendster Konstanz des Säure-Basen-Status kommt.

Nach 24 Stunden konnte ein Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums von $1,23 \pm 0,03$ auf $1,20 \pm 0,04$ $mmol \cdot l^{-1}$, ein Abfall des pH-Wertes von $7,357 \pm 0,035$ auf $7,318 \pm 0,038$ sowie ein Anstieg des pCO_2 von $49,4 \pm 7,59$ auf $53,2 \pm 0,25$ mm Hg festgestellt werden. Diese Veränderungen waren jedoch noch nicht signifikant.

Zu einer signifikanten Abnahme ($p \leq 0,01$) kam es jedoch unter diesen Lagerungsbedingungen im Verlauf von 24 Stunden in der Größe der auf einen pH-Wert von 7,4 kalkulierten Calciumionenkonzentration von $1,22 \pm 0,02$ auf $1,16 \pm 0,03$ mmol l^{-1}.

Werden die Vollblutproben bei einer Umgebungstemperatur von 21°C über 24 Stunden aufbewahrt, so kommt es in der Konzentration des ionisierten Calciums zu einem stetigen Anstieg mit Fortdauer der Lagerung. Die Veränderung in der Konzentration des ionisierten Calciums ist dabei besonders stark in den ersten 8 Stunden ausgeprägt. Diese Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums sind von einem Abfall des pH-Wertes bei Anstieg des pCO_2 begleitet. Auffällig ist dabei, daß es trotz weiterem starken Abfall des pH-Wertes nach der 8. Stunde der Lagerung bei massivem pCO_2-Anstieg

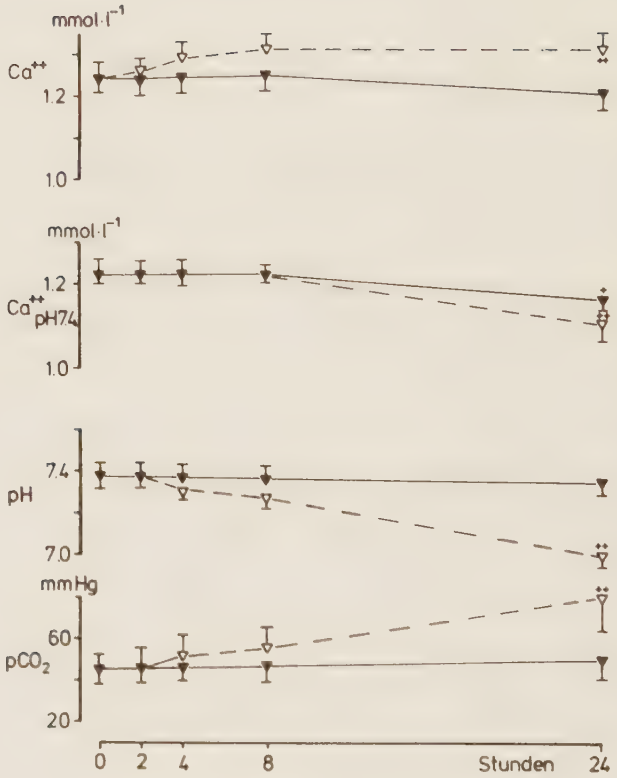

Abb. 6: Einfluß unterschiedlicher Lagerungsdauer und -temperatur auf die Konzentration des ionisierten Calciums, den pH und den Kohlendioxidpartialdruck in anaerob gelagerten Vollblutproben.

(▼= 4°C; ▽= 21°C; n = 20; $\bar{X} \pm SD$)
(++ = p (0,005 - 0,001) (+ = p (0,05 - 0,01)

nur noch zu geringen Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums kommt. Nach 24 Stunden sind alle eintretenden Veränderungen bei einer Lagerungstemperatur von 21° C signifikant ($p \leqq 0{,}001$). Wird die Konzentration des ionisierten Calciums auf einen pH-Wert von 7,4 bezogen, so wird auch hier ab der 8. Lagerungsstunde ein signifikanter Abfall ($p \leqq 0{,}001$) bis zur 24. Stunde sichtbar.

Wie auch in den Vollblutproben bei der Lagerungstemperatur von 4° C konnten wir in Liquorproben unter identischen Bedingungen im Verlauf von 8 Stunden keine signifikanten Veränderungen im Gesamtcalciumgehalt, in der Konzentration des ionisierten Calciums und im Säure-Basen-Status feststellen (Abbildung 7).

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß die bei der Lagerung von Blutproben feststellbaren Veränderungen im wesentlichen von der Art und der Dauer der Aufbewahrung abhängen.

Die zu beobachten Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums sind dabei nicht nur durch Verschiebungen der Wasserstoffionenkonzentration bedingt, sondern weisen auf die Interaktion des ionisierten Calciums mit noch anderen, während der Lagerung ablaufenden Prozessen hin. Die Lagerung der Vollblutproben sollte bei 4° C und die Analyse innerhalb von 8 Stunden erfolgen, damit Verfälschungen der Konzentration des ionisierten Calciums vermieden werden.

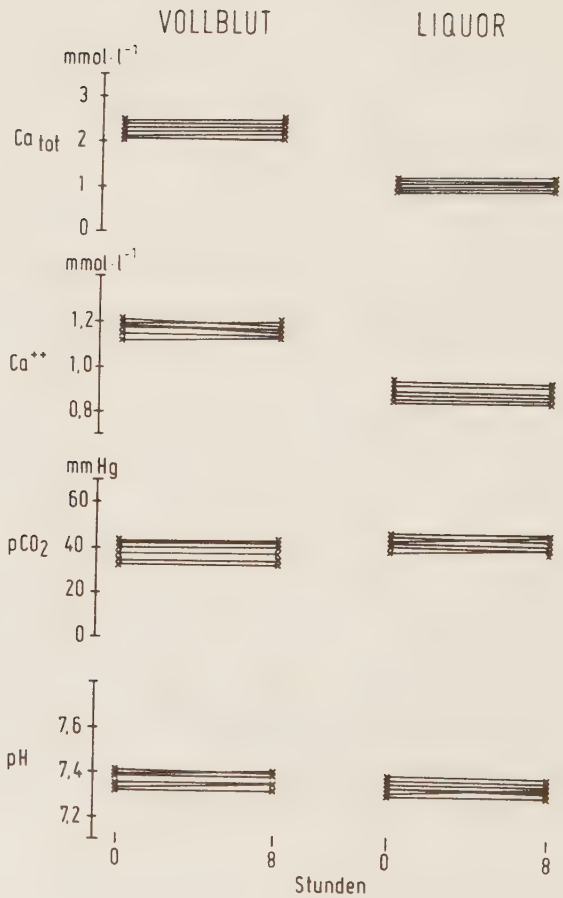

Abb. 7: Einfluß einer 8stündigen Lagerung von Vollblut- und Liquorproben unter anaeroben Bedingungen bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C auf das Gesamtcalcium, das ionisierte Calcium, den Kohlendioxidpartialdruck und den pH-Wert. (n = 6)

3.2.2.3. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Venostase

Weitere wesentliche verfälschende Faktoren stellen die Abnahmebedingungen dar. Die Angaben über das Ausmaß möglicher Verfälschungen der Resultate durch unterschiedliche Abnahmebedingungen divergieren stark.

Dieser Umstand veranlaßte uns, eine Studie über den Effekt der Venostase mit und ohne gleichzeitige aktive Bewegung des gestauten Armes durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 8 und 9 graphisch dargestellt.

Die Abbildung 8 zeigt das Verhalten des ionisierten Calciums, des Gesamtcalciums, des Proteins und des pH-Wertes bei einer Venostase durch externen Druck mit 100 mm Hg (20 - 40 mm Hg unterhalb des systolischen Blutdruckes) bei zehn Patienten ohne Störung der Homeostase des Calciums. Es ist zu sehen, daß es durch die Venostase im Verlauf von 3 Minuten zu Veränderungen in den gemessenen Parametern kommt, die besonders in der ersten Minute nach Beendigung der Venostase ausgeprägt sind. Bei allen Parametern kommt es bereits während der Venostase zu einem Anstieg der Werte. Die durch die Stase bedingten Veränderungen werden jedoch erst 1 Minute nach deren Beendigung mehr oder weniger signifikant.

Ungefähr 3-4 Minuten nach Beendigung der Stauung kehrten alle untersuchten Parameter auf das Ausgangsniveau zurück. Die von den einzelnen Arbeitsgruppen bei der Venostase vorgefundenen unterschiedlichen Ausmaße der eingetretenen Veränderungen sind zum Teil auf das recht differente Vorgehen zurückzuführen. Ein wesentlicher Faktor scheint dabei der Funktionszustand der gestauten Extremität zu sein. So führten wir auch eine Studie über den Effekt einer Venostase mit gleichzeitiger aktiver Bewegung des gestauten Armes auf die Konzentration des ionisierten Calciums durch. Die Venostase erfolgte ebenfalls mit einem Druck von 100 mm Hg über

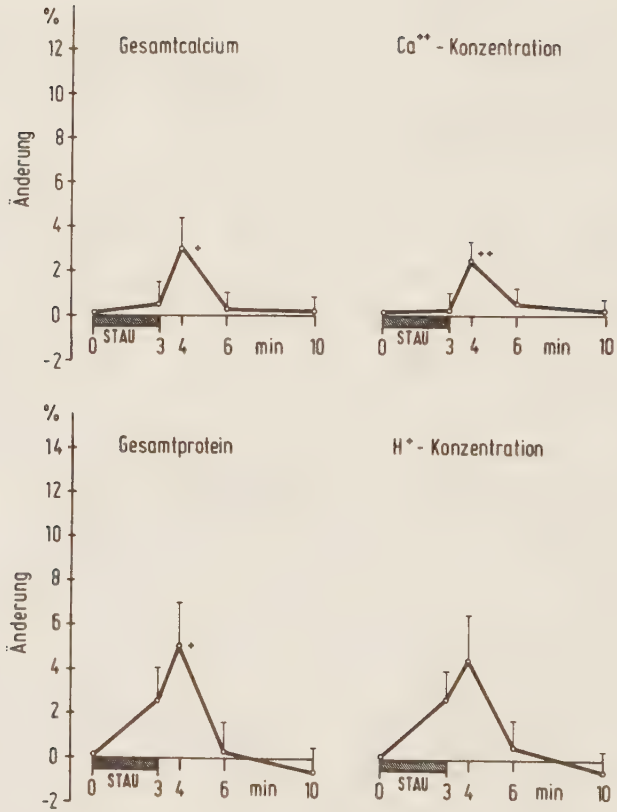

Abb. 9: Einfluß eines Armvenenstaues (3 Minuten mit 100 mm Hg) auf das Gesamtcalcium, die Calciumionenkonzentration, das Gesamtprotein und die Wasserstoffionenkonzentration. Aufgetragen ist die prozentuale Änderung.
(n = 10; $\bar{X} \pm$ SEM; + = $p < 0,05 - 0,01$; ++ = $p < 0,005 - 0,001$)

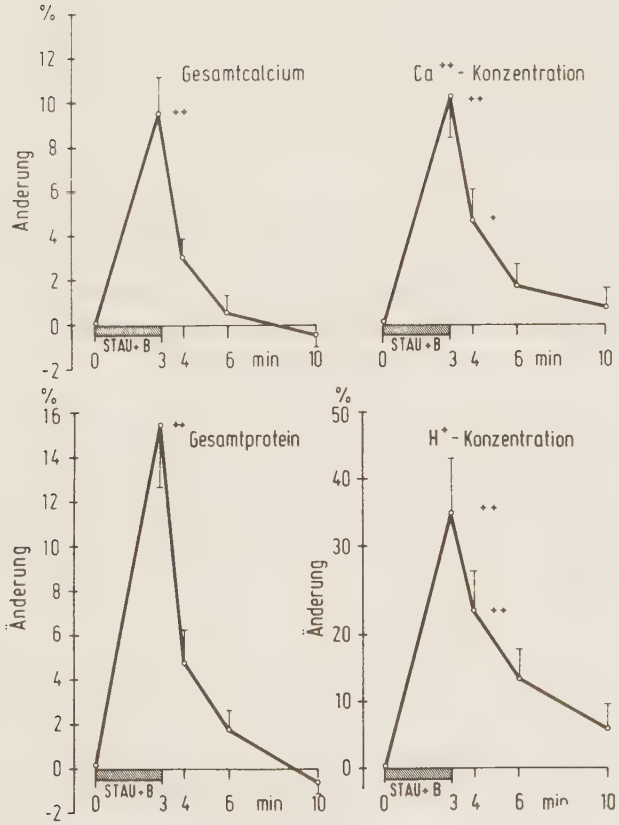

Abb. 9: Einfluß eines Armvenenstaues (3 Minuten mit 100 mm Hg) mit gleichzeitiger aktiver Armbewegung auf das Gesamtcalcium, die Calciumionenkonzentration, das Gesamtprotein und die Wasserstoffionenkonzentration. Aufgetragen ist die prozentuale Änderung.

(n = 10; X + SEM; + = p < 0,05 - 0,01; ++ = p < 0,005 - 0,001)

eine Dauer von 3 Minuten. Während der Stauung wurde mit der entsprechenden Hand ein Dynamometer betätigt.

Aus den in der Abbildung 9 gezeigten Resultaten ist zu erkennen, daß es hierbei noch während der Venostase zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg in den Konzentrationen des ionisierten Calciums, des Gesamtcalciums, des Gesamtproteins und der Wasserstoffionen kommt.

Unmittelbar nach Beendigung der Stauung und der aktiven Bewegung kommt es zu einem raschen Abfall der erhöhten Konzentrationen. Die Konzentrationen vom Gesamtcalcium und vom Gesamtprotein erreichen etwa nach 5 - 7 Minuten das Ausgangsniveau. Die Calcium- und Wasserstoffionenkonzentration sind auch nach 7 Minuten noch weiter erhöht.

Durch diese Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, daß die durch eine Venostase bedingten Veränderungen in der Blutzusammensetzung (Gesamtcalcium, Gesamtprotein, ionisiertes Calcium, Wasserstoffionen) bei gleichzeitiger aktiver Bewegung der gestauten Extremität bedeutend höher sind als bei relaxiertem Arm.

3.2.3. Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von verschiedenen physiologischen Faktoren

3.2.3.1. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in den verschiedenen Regionen des Kreislaufes

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise über das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in den verschiedenen Abschnitten des Kreislaufes.

Da bis heute detaillierte Untersuchungen zu dieser Problematik fehlen, untersuchten wir das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums unter Berücksichtigung des Säure-Basen-Status im arteriellen und venösen Schenkel des Kreislaufes. Blutproben wurden aus der V. cava caudalis, der A. pulmonalis, der Aorta abdominalis und dem linken Ventrikel

gewonnen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 10 dargestellt.

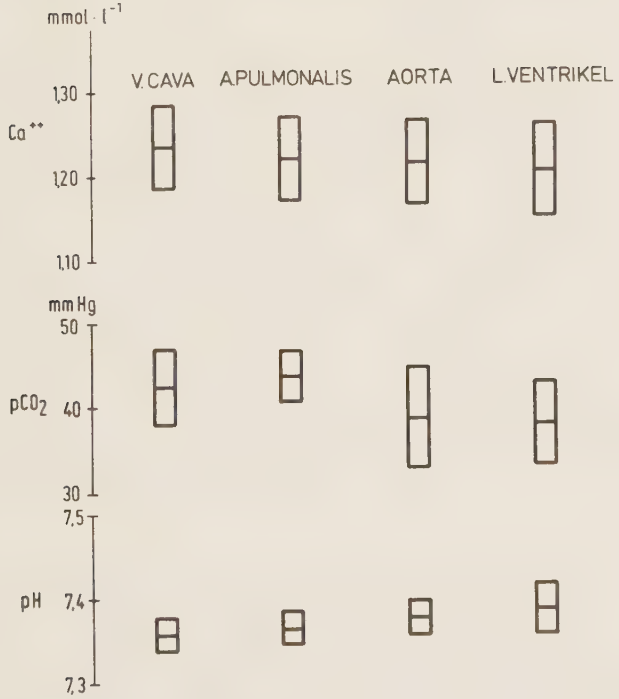

Abb. 10: Das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums, des Kohlendioxidpartialdruckes und des pH-Wertes in verschiedenen Regionen des Kreislaufes. (V. cava caudalis, A. pulmonalis, Aorta abdominalis, linker Ventrikel; $\bar{x} \pm SD$, n = 22)

Es ist zu sehen, daß die Mittelwerte bei annähernd identischen Schwankungsbreiten für das ionisierte Calcium im arteriellen Schenkel des Kreislaufes etwas niedriger liegen als im venösen. Die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes zeigt dabei ein identisches Verhalten.

Die Konzentrationsunterschiede des ionisierten Calciums zwischen arteriellem und venösem Schenkel des Kreislaufes sind dabei nicht signifikant.

Auf die Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums im Blut von der jeweiligen Wasserstoffionenkonzentration wurde in verschiedenen in vitro- und in vivo-Studien hingewiesen. In allen Fällen wurde eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Korrelation zwischen den Konzentrationen der Wasserstoff- und Calciumionen im Blut festgestellt. Auffällig dabei war, daß die durch pH-Veränderungen bedingten Verschiebungen in der Konzentration des ionisierten Calciums unter in vitro- und in vivo-Bedingungen ein unterschiedliches Ausmaß aufgewiesen haben. Diese Feststellungen waren der Anlaß, erneut Untersuchungen zum Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration druchzuführen und zu vergleichen.

3.2.3.2. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration unter "in vitro"-Bedingungen

Wird der pH-Wert der Vollblutproben durch Äquilibrierung mit unterschiedlichen Kohlendioxid-haltigen Gasgemischen (3,0 und 7,1 Vol.%) unter in vitro-Bedingungen verschoben, so induziert diese Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration auch eine Verschiebung des Ionisationsgrades vom Calcium. Wie aus den in der Abbildung 11 dargestellten Ergebnissen dieser Untersuchungen zu erkennen ist, beträgt der Abfall $\Delta \lg cCa^{++} / \Delta$ pH dabei durchschnittlich -0,22 ± 0,025 ($x \pm SD$) im pH-Bereich von 7,2 bis 7,6.

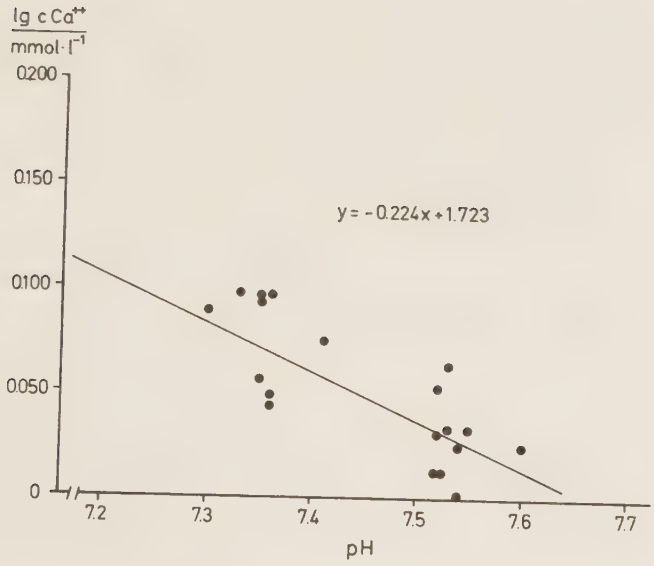

Abb. 11: Das Verhältnis zwischen ionisiertem Calcium ($lgcCa^{++}$) und pH in Vollblutproben gemessen nach der Äquilibrierung mit zwei unterschiedlichen Eichgasen mit einem Kohlendioxidgehalt von 3,0 bzw. 7,1 Vol.% bei einem Rest-Sauerstoff mit 97,0 und 92,9 Vol.%. (n = 10)

3.2.3.3. Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration unter "in vivo"-Bedingungen

Bei den wenigen bisher durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich des Effektes einer Hyperventilation auf das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums erfolgte die Bestimmung der Meßparameter im venösen Blut. Dieser Umstand veranlaßte uns dazu, den Effekt der Veränderung des Säure-Basen-Status durch Hyperventilation auf den Ionisationsgrad des Calciums sowohl im venösen als auch im arteriellen Schenkel des Kreislaufes zu untersuchen.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt. Sie zeigen, daß es durch Hyperventilation zu einem Abfall des Kohlendioxidpartialdruckes im Blut kommt. Der Abfall des Kohlendioxidgehaltes bedingt einen Anstieg des pH-Wertes des Blutes und führt so zu einer respiratorischen Alkalose. Die respiratorisch induzierten Veränderungen sind dabei besonders deutlich im arteriellen Schenkel des Kreislaufes ausgeprägt. So steigt der pH-Wert von durchschnittlich 7,356 auf 7,455 an und der pCO_2 fällt von 44,5 auf 27,2 mm Hg im venösen Schenkel ab.

Im arteriellen Blut steigt der pH-Wert von 7,377 auf 7,584 an und der pCO_2 fällt von durchschnittlich 39,6 auf 18,7 mm Hg ab. Das ionisierte Calcium sinkt bei den durch die Hyperventilation bedingten Änderungen des Säure-Basen-Status im venösen Blut von durchschnittlich 1,24 auf 1,23 und im arteriellen Blut von 1,21 auf 1,15 mmol l^{-1} ab.

Aus diesen Ergebnissen, dargestellt in einem Diagramm in Abbildung 13, wird ersichtlich, daß unter in vivo-Bedingungen die Änderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums bedingt durch Verschiebung des pH-Wertes ($\Delta lgCa^{++}/\Delta pH$) -0,15 betragen.

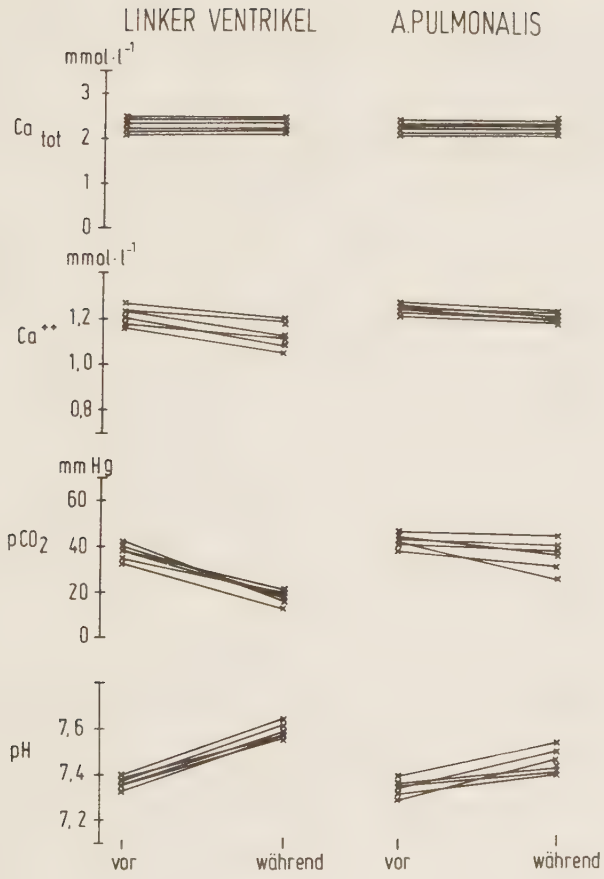

Abb. 12: Das Verhalten von Gesamtcalcium, ionisiertem Calcium, Kohlendioxidpartialdruck und pH-Wert während einer 3minütigen Hyperventilation im Blut des linken Ventrikels und der A. pulmonalis. (n = 6)

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse unterstreichen damit, daß die zwischen der Konzentration des ionisierten Calciums und dem pH bestehende inverse Korrelation ein unterschiedliches Verhalten unter "in vivo"- und "in vitro"-Bedingungen aufweist.

Der Gesamtcalcium- und Gesamtproteingehalt des Blutes werden während der Hyperventilation nicht verändert.

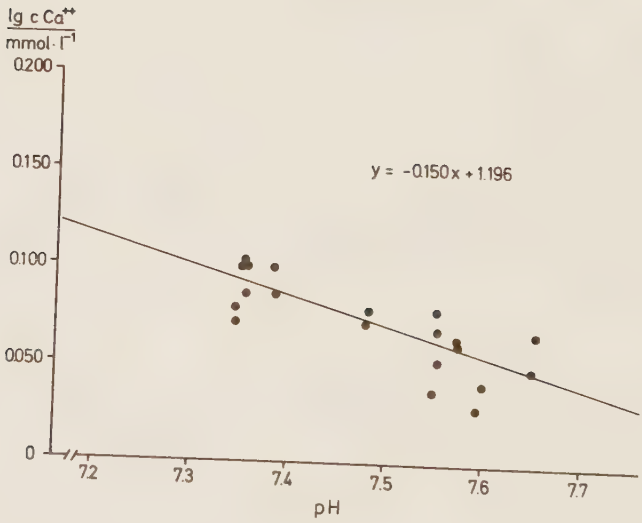

Abb. 13: Das Verhältnis zwischen ionisiertem Calcium ($lgcCa^{++}$) und pH im arteriellen Blut, gemessen bei Veränderung des pH-Wertes in vivo durch Hyperventilation (n = 10).

3.2.3.4. Konzentration des Gesamtcalciums im Serum (Normalwertbereich)

Die Bestimmung des Gesamtcalciumgehaltes im Serum oder Plasma ist bei der Analyse des ionisierten Calciums im Blut zur Einschätzung möglicher Wechselbeziehungen unumgänglich.

Die Konzentration des Gesamtcalciums im Serum betrug bei unseren Untersuchungen (80 Probanden ohne Calcium-Stoffwechselstörungen) durchschnittlich $2{,}38 \pm 0{,}09$ mmol·l^{-1} mit einem Normbereich von 2,20 bis 2,56 mmol·l^{-1}.

Die bei den weiblichen Personen ermittelten Werte lagen um durchschnittlich 0,06 mmol·l^{-1} niedriger als bei den männlichen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine Altersabhängigkeit des Gesamtcalciumgehaltes konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse sind im Vergleich mit Angaben aus der Literatur in der Abbildung 14 aufgezeigt.

3.2.3.5. Konzentration des ionisierten Calciums im Serum (Normalwertbereich)

Bei den Untersuchungen der Konzentration des ionisierten Calciums im Serum wurde erneut deutlich, daß der ermittelte Normalwertbereich eine starke Abhängigkeit von dem jeweils eingesetzten Elektrodentyp aufweist.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 15 im Vergleich mit anderen vorliegenden Daten dargestellt.

So wurde mit dem ORION SS-20-Analyzer ein durchschnittlicher Wert von $1{,}16 \pm 0{,}05$ mmol·l^{-1} für die Konzentration des ionisierten Calciums im Serum mit einem Normbereich von 1,06 bis 1,26 mmol·l^{-1} bestimmt.
Bei der Analyse mit dem AVL 980 wurde ein Mittelwert von $1{,}20 \pm 0{,}04$ mmol·l^{-1} bei einem Normbereich von 1,12 - 1,28 mmol·l^{-1} ermittelt.

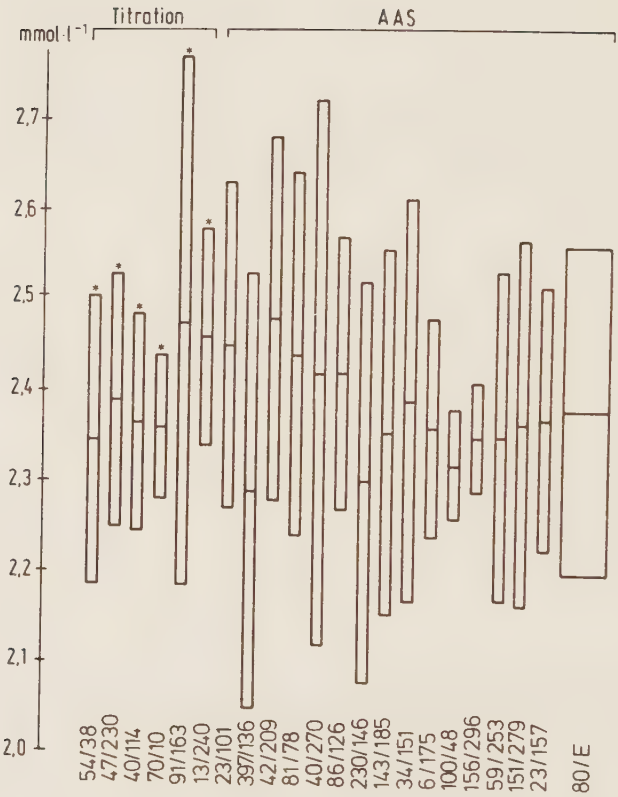

Abb. 14: Vergleich des Normalwertbereiches der Gesamtcalciumkonzentration im Serum mit Angaben aus der Literatur. (*EDTA-Titration; $\frac{\text{Autor}}{n}$; E = eigene Resultate; $\bar{X} \pm 2\ SD$)

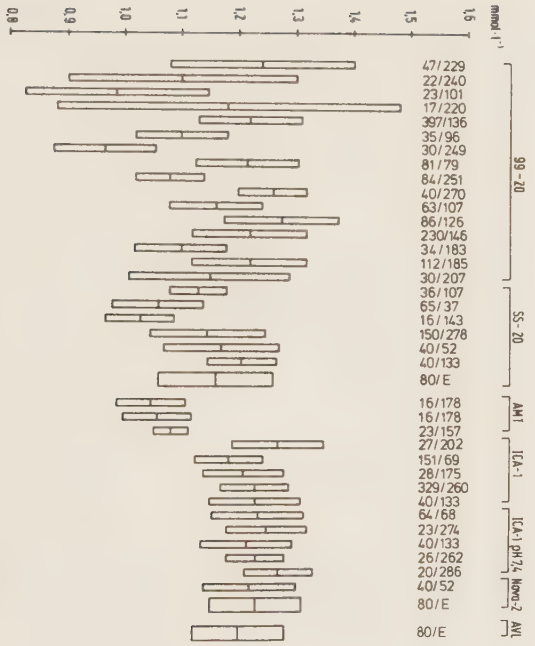

Abb. 15: Vergleich des Normwertbereiches der Konzentration des ionisierten Calciums im Serum mit Angaben aus der Literatur bei Berücksichtigung der eingesetzten Analyzer mit ionenselektiven Elektroden.
($\frac{\text{Autor}}{n}$; E = eigene Resultate; $\bar{X} \pm 2\,SD$)

Die Messungen mit dem NOVA 2 Analyzer ergaben eine durchschnittliche Calciumionenkonzentration von 1,23 ± 0,04 $mmol \cdot l^{-1}$ und einen Normbereich von 1,15 - 1,31 $mmol \cdot l^{-1}$ im Serum.

Auch in der Konzentration des ionisierten Calciums im Serum konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Personen gesehen werden. Eine Altersabhängigkeit bestand nicht.

Zwichen der Konzentration des Gesamtcalciums und der des ionisierten Calciums im Serum ließ sich keine engere Korrelation (r = 0,443) ermitteln (Abbildung 16).

Der Ionisationsgrad des Calciums im Serum zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der eingesetzten Elektrode zur Bestimmung des ionisierten Calciums. So ermittelten wir bei den eingesetzten Analyzern durchschnittliche Ionisationsgrade von 48,7, 50,4 und 51,7 %.

3.2.3.6. Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut (Normalwertbereich)

Mit den Elektroden der Calciumionen-Analyzer ORION SS-20, AVL 980, NOVA 2 und 8 sowie dem ICA1 ist eine direkte Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut möglich.

Bei der Analyse des ionisierten Calciums im Vollblut wurde ebenfalls deutlich, daß die jeweils ermittelten Mittel- und Normwertbereiche, ähnlich wie bereits bei den vorangegangenen Analysen, eine Abhängigkeit vom eingesetzten Elektrodentyp aufweisen.

So wurde mit dem ORION SS-20 eine durchschnittliche Konzentration für das ionisierte Calcium im Vollblut von 1,12 ± 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Normbereich von 1,02 - 1,22 $mmol \cdot l^{-1}$ ermittelt. Mit dem AVL 980 wurde ein Mittelwert von 1,18 ± 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Normbereich von 1,08 - 1,28 $mmol \cdot l^{-1}$ und mit dem NOVA 2 ein Mittelwert von 1,21 ± 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$ bei einem Normbereich von 1,11 - 1,31 $mmol \cdot l^{-1}$ ernalten.

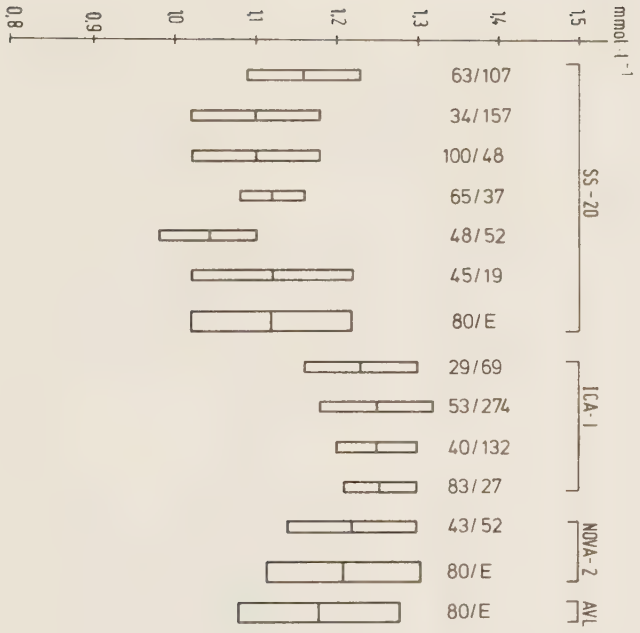

Abb. 16: Vergleich des Normwertbereiches der Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut mit Angaben aus der Literatur bei Berücksichtigung der eingesetzten Analyzer mit ionenselektiven Elektroden.
($\frac{\text{Autor}}{n}$; E = eigene Resultate; $\bar{X} \pm 2$ SD)

Auch bei der Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut wurden mit dem ORION SS-20 die niedrigsten und mit dem NOVA 2 die höchsten Werte gemessen. Die Schwankungsbreite der Meßwerte war bei allen Geräten in etwa gleich groß.

In der Abbildung 17 sind die erhaltenen Resultate vergleichend mit Angaben aus der Literatur aufgezeigt. Aus den Messungen der Konzentration des ionisierten Calciums im Serum und im Blut wird deutlich, daß die im Vollblut ermittelten Werte um durchschnittlich 0,02 - 0,04 $mmol \cdot l^{-1}$ niedriger liegen als im Serum.

Werden die im Vollblut mit dem NOVA 2 gemessenen Werte der Konzentration des ionisierten Calciums in einer Verteilungskurve und in einem Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragen, so zeigt sich eine Normalverteilung (Abbildung 18).

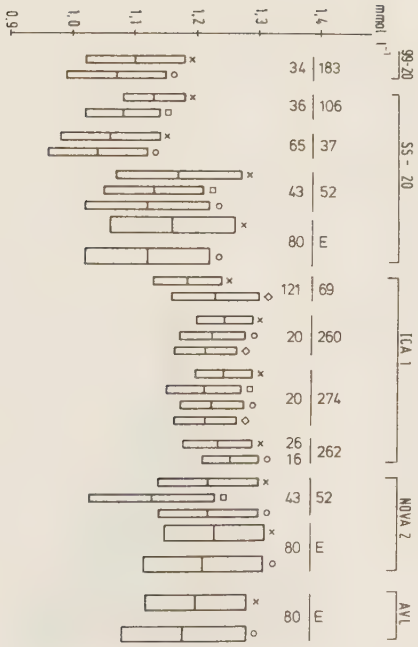

Abb. 17: Vergleich der Normalwertbereiche der Konzentration des ionisierten Calciums mit Angaben in der Literatur bei Berücksichtigung der eingesetzten Analyzer mit ionenselektiven Elektroden.

(✕ = Serum, □ = Plasma, ○ = Venenblut, ◇ = Kapillarblut, $\frac{\text{Autor}}{n}$; E = eigene Resultate; $\bar{X} \pm 2\,SD$)

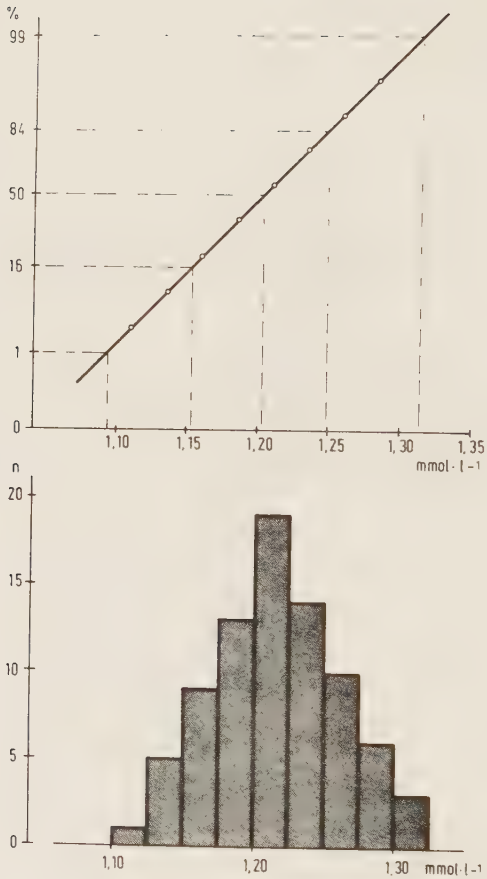

Abb. 18: Die Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut bestimmt mit dem NOVA 2 Analyzer im Rahmen einer Normalwert-Studie bei 80 gesunden Probanden aufgetragen in einer Verteilungskurve (unten) und in einem Wahrscheinlichkeitsnetz (oben).
($\bar{x}$ = 1,21 ± 0,05 mmol·l^{-1})

3.2.4. Konzentration des ionisierten Calciums im Liquor cerebrospinalis

Gleichzeitig mit dem Verhalten des ionisierten Calciums im Blut untersuchten wir auch die Konzentration der Calciumionen im Liquor cerebrospinalis bei Patienten ohne Störung der Homeostase.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 19 im Vergleich mit Angaben aus der Literatur dargestellt. Es konnte festgestellt werden, daß die Konzentration des ionisierten Calciums im Liquor $0{,}90 \pm 0{,}04$ mmol·l^{-1} bei einem Gesamtcalciumgehalt von $1{,}15 \pm 0{,}06$ mmol·l^{-1} beträgt.

Der pH-Wert lag durchschnittlich bei 7,346 und der pCO_2 bei 44,9 mm Hg.

Aus den vorliegenden Resultaten ist ersichtlich, daß sowohl die Konzentration des ionisierten Calciums als auch die des Gesamtcalciums im Liquor cerebrospinalis unter den im Vollblut gemessenen Werten liegen. Im Liquor sind durchschnittlich 78 % des Gesamtcalciums ionisiert, während im Blut der Ionisationsgrad des Calciums nur 50 % beträgt. Diese Werte ergaben einen Liquor-Blut-Quotienten für das ionisierte Calcium bei unseren Untersuchungen von 0,73.

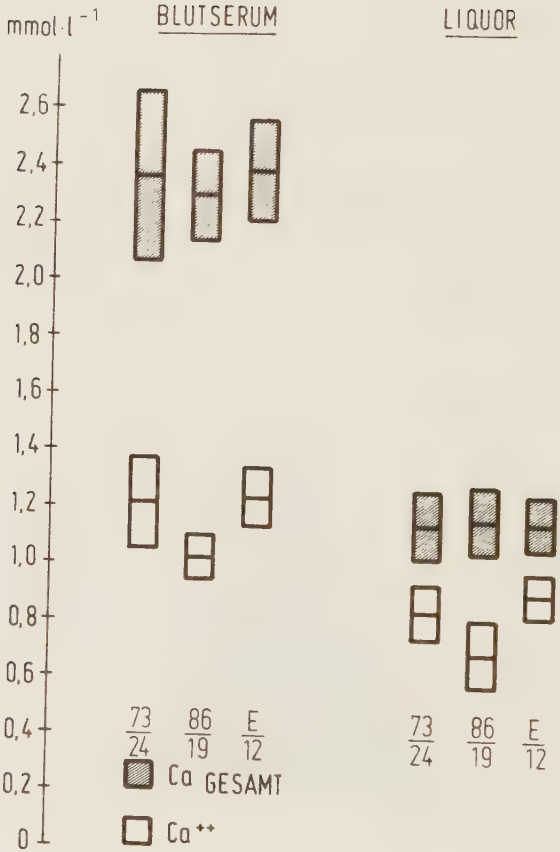

Abb. 19: Die Konzentrationen von Gesamtcalcium und ionisiertem Calcium im Blutserum und Liquor cerebrospinalis im Vergleich mit Angaben in der Literatur.
($\frac{\text{Autor}}{n}$; E = eigene Resultate; $\bar{x} \pm SD$)

4. DISKUSSION

Seit der Einführung der ionenselektiven Elektroden zur Messung des ionisierten Calciums in den 60iger Jahren und besonders nach der Verfügbarkeit verschiedener Meßsysteme für den Klinikbetrieb wurde das Interesse an der Messung des ionisierten Calciums stark geweckt. In den folgenden Jahren häuften sich die Untersuchungen über das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums im Rahmen verschiedener Erkrankungen. Die Ergebnisse dieser klinischen Untersuchungen waren zum Teil recht unterschiedlich und die Aussagen hinsichtlich der klinischen Relevanz der Bestimmung des ionisierten Calciums im Blut divergieren stark.

In der vorliegenden Arbeit sollte vor allem geklärt werden, in welchem Maße methodische und physiologische Faktoren auf die Aussagefähigkeit der gemessenen Konzentration des ionisierten Calciums für die Klinik relevant sind.

1. Qualitätskontrolle:

Die Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums im Blut ist heute mit Hilfe verschiedener halb- bzw. vollautomatischer Analysevorrichtungen möglich. Die dabei eingesetzten ionenselektiven Elektroden weisen unterschiedliche Charakteristika auf, so daß mit den verschiedenen Systemen mehr oder weniger stark divergierende Normwertbereiche ermittelt wurden.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums von dem eingesetzten Analyzer zeigten, daß eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Abhängigkeit besteht.

In wäßrigen Standards mit Konzentrationen des ionisierten Calciums von 0,50 bis 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$ wurde bei allen Analyzern (ORION SS-20, AVL 980, NOVA 2, NOVA 8, ICA1) eine gute Reproduzierbarkeit der Messung bei einem Variationskoeffizienten von unter 1 % in der Serie erzielt.

Dieses Ergebnis zeigt Übereinstimmung mit den von anderen Autoren bei den einzelnen Systemen gemachten Angaben (19, 28, 52, 76, 77, 106, 133, 152, 242).

Während die mit den Systemen SS-20, AVL 980 und NOVA 2 erzielten Mittelwerte mehr oder weniger stark vom Sollwert abwichen, waren diese bei dem NOVA 8 und dem ICA1 identisch über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Die größten und signifikanten Abweichungen vom Sollwert wurden dabei mit dem AVL 980 bei einer Konzentration des Calciums von 1,50 und 2,50 $mmol \cdot l^{-1}$ gemessen.

Die Messungen von aktuell ionisiertem Calcium und pH-Wert mit dem NOVA 8 und dem ICA1 in wäßrigen Standards wiesen eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit, einen Variationskoeffizienten von unter 1 % und identische Werte auf. Die mit dem ORION SS-20, dem AVL 980 und dem NOVA 2 durchgeführten Analysen in Poolseren ergaben keine signifikant unterschiedlichen Werte für das ionisierte Calcium. Der Variationskoeffizient lag dabei in der Serie zwischen 0,7 und 0,8 % und von Tag zu Tag zwischen 1,3 und 1,8 %. Ähnliche Angaben für die einzelnen Gerätetypen wurden bereits von anderen Autoren gewonnen (19, 28, 52, 76, 77, 106, 133, 152, 242).

Bei der Serien-Analyse des ionisierten Calciums in Vollblutproben mit den Analyzern ORION SS-20, AVL 980 und NOVA 2 wurden bei guter Reproduzierbarkeit signifikant unterschiedliche Konzentrationen gemessen. So wurde mit dem NOVA 2 die höchste und mit dem ORION SS-20 die niedrigste Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut bei nahezu identischen Variationskoeffizienten gemessen.

DROP et al. (1982) haben ähnliche signifikante Unterschiede bei der Messung der Konzentration des ionisierten Calciums in Vollblutproben mit dem ORION SS-20 und dem NOVA 2 ermittelt. Auch diese Autoren stellten dagegen bei der Analyse von Serum- und Plasmaproben nur geringe meßtechnische Unterschiede fest.

Als Ursache der signifikanten Konzentrationsunterschiede im Vollblut bei der Messung des ionisierten Calciums mit den verschiedenen Analyzern (ORION SS-20, AVL 980, NOVA 2) kann ein unterschiedliches Ausmaß an Interferenzen besonders seitens der Erythrozyten auf die ionenselektiven Elektroden angenommen werden (148, 257, 262, 274).

So konnten FERREIRA und BOLD (1979) bei ihren Messungen mit dem ORION SS-20 einen beträchtlichen Verfälschungseffekt des Meßwertes seitens der Erythrozyten feststellen.

Die bei der Messung des ionisierten Calciums im Routinebetrieb festgestellte relativ große inter- und intraindividuelle Schwankungsbreite der Meßwerte zwischen 0,83 und 1,29 $mmol \cdot l^{-1}$ beruhte im wesentlichen auf die nicht immer ausreichende Einhaltung der Standardbedingungen bei der Blutentnahme. Die Notwendigkeit einer standardisierten Blutentnahme bei der Bestimmung des ionisierten Calciums wurde dabei deutlich unterstreichen.

2. Einfluß präanalytischer Faktoren:

Das Ausmaß der durch einzelne präanalytische Faktoren induzierten Veränderung der Konzentration des ionisierten Calciums war schließlich Gegenstand weiterer Untersuchungen:

Einfluß der Heparinisierung:

Es stellte sich heraus, daß eine recht unterschiedliche Heparinisierung der Proben eine nicht unwesentliche Rolle bei der Verfälschung der Meßergebnisse spielte.

So führt Heparin in einer Konzentration über 10 $I.E. \cdot ml^{-1}$ zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Verminderung der Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut.

Geringe Heparinkonzentrationen (unter 10 I.E.) hatten ebenfalls einen senkenden, jedoch noch nicht signifikanten Effekt auf das freie ionisierte Calcium zur Folge, bargen aber die Gefahr der unvollständigen Antikoagulation und Systemverstopfung.

Auch BISWAS et al. (1981) beobachteten bereits ab einer Heparinkonzentration von 2 I.E. je ml Blut einen Abfall der Calciumionenkonzentration. Diese und auch unsere Resultate widersprechen den Angaben von anderen Autoren, die erst ab einer Heparinkonzentration von 20 I.E. je ml Blut einen signifikanten Abfall des ionisierten Calciums konstatierten (26, 48, 219, 275).

Die Konzentration des Gesamtcalciums und der pH-Wert wurden bis zu einer Heparinkonzentration von 250 I.E.·ml^{-1} nicht nachweisbar verändert.

Über die Konstanz des Gesamtcalciumgehaltes im Blut bei Bestimmung mit der AAS unter Heparinapplikation berichtete bereits PASCHEN (1975).

Als Ursache des senkenden Effektes durch Heparin auf die freien Calciumionen im Blut wird die Bildung von Heparin-Calcium-Komplexen angenommen. Auch ein direkter Effekt des Heparins auf das "liquid junction" bei der potentiometrischen Calciumionenmessung wird für möglich gehalten (133). Der verfälschende Effekt seitens des Heparins auf die Bestimmung des ionisierten Calciums im Blut kann, wie unsere Untersuchungen zeigten, durch eine dem Plasmacalciumgehalt adäquate $CaCl_2$-Substitution des Heparins aufgehoben werden. Der Gesamtcalciumgehalt, die Konzentration des ionisierten Calciums und der pH-Wert der Probe erfahren durch die $CaCl_2$-Substitution keine wesentlichen Verfälschungen. Die Eliminierung der Wertverlagerung durch $CaCl_2$-substituiertes Heparin im normalen Bereich bedeutet bei niedrigen Konzentrationen des ionisierten Calciums im Blut einen positiven Fehler von unter 1 %. Hohe Konzentrationen des ionisierten Calciums werden durch einen entsprechenden kleinen Negativfehler beeinträchtigt (260).

Die dem Heparin zugeführte Calciummenge hängt auch von der Heparinquelle selbst ab. So benötigte eine Heparinlösung von 5000 I.E.·ml^{-1} eine Zuführung von $CaCl_2$ auf eine Konzentration von 12 mmol·l^{-1}, um eine Calciumionenkonzentration von

1,25 $mmol \cdot l^{-1}$ zu schaffen (260).

Durch die vorliegende Studie wird auch gezeigt, daß der senkende Effekt des Heparins auf die Konzentration des ionisierten Calciums im wesentlichen auf eine Komplexbildung mit den Calciumionen beruht. So führen steigende Konzentrationen $CaCl_2$-substituierten Heparins zu keiner weiteren Verfälschung des Meßwertes.

Die Untersuchungsergebnisse erklären einen Teil der bei unserer Routinebestimmung beobachteten nicht unerheblichen intra- und interindividuellen Schwankungsbreite der Werte für das ionisierte Calcium.

Zur Lösung dieses nicht unerheblichen Problems ist die $CaCl_2$-Applikation - bis zu einer im Plasma adäquaten Calciumionenkonzentration - zum Heparin vorzunehmen. Durch den Einsatz geringster Heparinmengen (unter 10 I.E. je ml Blut) läßt sich zwar eine "signifikante" Verfälschung der gemessenen Calciumionenkonzentration vermeiden, das Risiko der Koagulation der Proben und damit der Systemverstopfung steigt dabei jedoch in erheblichem Maße.

Einfluß der Probenlagerung:

Eine nicht einwandfreie Probenlagerung stellt eine weitere Fehlerquelle bei der Bestimmung des ionisierten Calciums dar. So ist die Frage nach der optimalen Lagerungstechnik zur Wahrung der Ausgangsbedingungen unumgänglich. Nachdem diese von verschiedenen Arbeitsgruppen bisher unterschiedlich beantwortet wurde, führten wir Untersuchungen über das Verhalten der Konzentration des ionisierten Calciums in Vollblut- und Liquorproben in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und -dauer durch.

Da zwischen dem Ionisationsgrad des Calciums und der Wasserstoffionenkonzentration im Blut eine enge Korrelation besteht (s. S. 35; 9, 48, 69, 93, 164, 185, 196, 198), wurde auch gleichzeitig der Säure-Basen-Status miterfaßt.

Bei einer Lagerungstemperatur von 4°C konnten im Verlauf von 8 Stunden in Vollblut- und Liquorproben keine signifikanten Veränderungen im Gesamtcalciumgehalt, in der Konzentration des ionisierten Calciums und im Säure-Basen-Status gemessen werden.

Nach 24stündiger Lagerung der Vollblutproben wurde sowohl in der Calciumionenkonzentration als auch im pH-Wert eine Abnahme beobachtet. Die Erniedrigung der Konzentration des ionisierten Calciums trotz Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration im Blut wird durch den Bezug der Calciumionenkonzentration auf einen pH-Wert von 7,4 und dem dabei festgestellten signifikanten Abfall unterstrichen.

Diese Beobachtungen widersprechen den Angaben von FUCHS (1974), der bei 4°C einen Anstieg der Konzentration des ionisierten Calciums bei sinkendem pH-Wert ermittelte. Andere Autoren (19, 106, 136, 185) konnten unter identischen Lagerungsbedingungen in Serumproben erst nach Tagen einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Abfall in der Konzentration des ionisierten Calciums nachweisen.

Werden die Blutproben bei 21°C gelagert, so kommt es bereits bis zur 8. Stunde nach der Probennahme zu einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0,01$) der Konzentration des ionisierten Calciums korreliert mit einem Anstieg der Wasserstoffionenkonzentration und des Kohlendioxidgehaltes der Proben. Das Bestehen einer engen inversen Korrelation zwischen der Konzentration des ionisierten Calciums und dem pH wird durch die fehlende Veränderung der auf einen pH von 7,4 korrigierten Calciumionenkonzentration in den ersten 8 Stunden unterstrichen. Die im weiteren Lagerungsverlauf zu beobachtenden Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums sind nicht nur durch Verschiebungen der Wasserstoffionenkonzentration bedingt, sondern weisen auf die Interaktion des ionisierten Calciums mit noch anderen während der Lagerung ablaufenden Prozessen hin. Die Komplexbildung mit Laktat spielt dabei sicherlich nicht

eine unwesentliche Rolle (260). Aufgrund unserer Befunde und der Angaben anderer Autoren für Serum- und Plasmaproben (73, 126, 179) sollten Liquor- und Vollblutproben zur Bestimmung des ionisierten Calciums bei 4°C gelagert werden und die Analyse innerhalb von 8 Stunden erfolgen.

Einfluß einer Venostase mit und ohne gleichzeitige aktive Armbewegung:

Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, in welchem Maße es durch eine Venostase mit und ohne gleichzeitige aktive Armbewegung zu Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums kommt.

Es konnte gezeigt werden, daß es durch eine Venostase (3 Minuten 100 mm Hg) zu Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums, des Gesamtcalciums, des Gesamtproteins und der Wasserstoffionenkonzentration kommt. Die zu messenden Konzentrationsanstiege werden dabei jedoch erst 1 Minute nach Beendigung der Venostase mehr oder weniger signifikant. Dies stimmt gut mit den von RENOE et al. (1980) bei identischem Vorgehen gemachten Beobachtungen überein.

Keine signifikanten Änderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums im Verlauf einer Venostase konnten auch bereits andere Autoren beobachten (11, 108, 136, 271). Über signifikante Anstiege der Gesamtprotein- und Gesamtcalciumkonzentration, verursacht durch eine Venostase, wurde in anderen Arbeiten berichtet (11, 34, 45, 108, 116, 181, 182, 237).

In der Wasserstoffionenkonzentration wurde in Übereinstimmung mit den Angaben anderer Autoren keine signifikante Änderung während und nach der 3minütigen Stauung festgestellt (223, 271).

Die von den einzelnen Gruppen bei der Venostase vorgefundenen unterschiedlichen Ausmaße der Veränderungen sind zum Teil auf das recht unterschiedliche Vorgehen zurückzuführen. So wiesen GERBRANDY et al. (1960) bereits darauf hin, daß

nicht unberücksichtigt bleiben sollte, ob der gestaute Arm relaxiert oder angespannt ist bzw. aktiv bewegt wird. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die durch Venostase bedingten Veränderungen in der Blutzusammensetzung (Gesamtcalcium, Gesamtprotein, ionisiertes Calcium, Wasserstoffionen) bei gleichzeitiger aktiver Bewegung der gestauten Extremität früher eintreten und bedeutend höher sind als bei relaxiertem Arm. Dieser Befund stimmt gut mit der von RENOE et al. (1980) gemachten Beobachtung überein.

Die meisten der festgestellten Veränderungen während der Venostase können auf eine Hämokonzentration, bedingt durch Venendruckanstieg, zurückgeführt werden. Das Ausmaß der eintretenden Veränderungen ist dabei eine Funktion von Dauer und Druckhöhe der Venostase. Gleichzeitig besteht eine deutliche Abhängigkeit vom Funktionszustand (Relaxation oder aktive Bewegung) der gestauten Extremität (83). Der Anstieg der Wasserstoffionenkonzentration während der Venostase, besonders bei gleichzeitiger aktiver Armbewegung, ist durch einen gesteigerten anaeroben Stoffwechsel bei vermindertem Abfluß der Stoffwechselprodukte bedingt. Diese Änderung der Wasserstoffionenkonzentration induziert einen Anstieg des Ionisationsgrades des Calciums im Blut. Bei gleichzeitigem Anstieg der Gesamtcalciumkonzentration im Blut resultiert daraus eine deutliche signifikante Zunahme der Konzentration des ionisierten Calciums.

Der unterschiedliche Zeitverlauf der festgestellten Veränderungen bei der Venostase mit und ohne gleichzeitige aktive Armbewegung kann zu einem Teil auf die unterschiedlichen hämodynamischen Verhältnisse zurückgeführt werden.

Am relaxierten gestauten Arm kommt es bereits in den ersten 5 Minuten nach der Beendigung zu einer vollständigen Normalisierung der Blutzusammensetzung. Wird der Arm jedoch während der Stauung aktiv bewegt, so ist die Dauer der Normalisierung bedeutend länger.

Dies besagt, daß die Blutentnahme am relaxierten Arm und

nur nach einer kurzzeitigen Stauung (unter 1 Minute) erfolgen sollte. Dann kann davon ausgegangen werden, daß Normalverhältnisse vorliegen.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse unterstreichen deutlich die eingangs erwähnte Annahme, daß die Entnahmebedingungen bei der Gewinnung von Blut zur Analyse des ionisierten Calciums die Quelle größerer Verfälschungen sein können. Aus den bisher dargelegten Gründen ist eine Blutentnahme zur Analyse des ionisierten Calciums unter "Standardbedingungen" unumgänglich.

So sollte die Blutentnahme unter den nachfolgenden Bedingungen erfolgen:

1. Abnahme zwischen 8 und 9 Uhr morgens
2. Umgebungstemperatur zwischen 18 und 25 °C
3. vor der Blutentnahme 10minütiges Liegen des Probanden
4. vor der Blutentnahme 12 Stunden Nüchternheit
5. Venenpunktion bei maximaler Stauung von 1 Minute
6. Blutentnahme am relaxierten Arm ohne größeren Sog
7. Heparinisierung der Spritzen und Vacutainer mit Calcium-substituiertem Heparin
8. Aufbewahrung der Blutproben unter anaeroben Bedingungen bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C
9. Analyse der Proben innerhalb von 8 Stunden

3. Einfluß physiologischer Faktoren:

Da es in der Literatur nur wenige Hinweise hinsichtlich des Verhaltens des ionisierten Calciums in den verschiedenen Kreislaufregionen gibt, führten wir eine diesbezügliche Studie im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung durch.

DROP et al. (1978, 1980) konnten nur geringe nicht signifikante Unterschiede in der Konzentration des ionisierten Calciums zwischen arteriellem und venösem Blut nachweisen. WANDRUP und KANCIR (1983) fanden nur geringe, jedoch signifikante Unterschiede in der Calciumionenkonzentration des arteriellen und venösen Blutes.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden im arteriellen Schenkel des Kreislaufes niedrigere Konzentrationen des ionisierten Calciums als im venösen Schenkel ermittelt. Die gemessenen Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Die Wasserstoffionenkonzentration zeigte ein ähnliches Verhalten. Auf die Abhängigkeit der Konzentration des ionisierten Calciums im Blut von der jeweiligen Wasserstoffionenkonzentration wurde in verschiedenen in vitro- (68, 69, 164, 175, 185, 273, 274) und in vivo-Studien (73, 251) hingewiesen. In allen Fällen wurde eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Korrelation zwischen den Konzentrationen der Wasserstoff- und Calciumionen im Blut festgestellt.

Auffällig dabei war, daß die durch pH-Wert-Veränderungen bedingten Verschiebungen in der Konzentration des ionisierten Calciums unter in vitro- und in vivo-Bedingungen ein unterschiedliches Ausmaß aufgewiesen haben. Diese Feststellungen waren der Anlaß, detaillierte Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchzuführen.

Unter in vitro-Bedingungen stellten wir für das Verhältnis $\Delta \lg cCa^{++}/\Delta pH$ eine Größe von -0,22 und unter in vivo-Bedingungen von -0,15 fest.

Auch unsere Untersuchungen zeigen somit eine inverse Korrelation zwischen dem ionisierten Calcium und dem pH und stimmen hier mit den Angaben anderer Autoren überein (9, 48, 68, 69, 73, 185, 198, 273, 274).

Die Ursache für die Änderung der Konzentration des ionisierten Calciums in Abhängigkeit von dem pH-Wert wird in einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der Proteine bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen gesehen (175, 196, 197, 198, 204).

Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen abermals, daß es davon abhängt, ob die Relation zwischen pH und ionisiertem Calcium unter in vitro- oder in vivo-Bedingungen analysiert wurde.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die zwischen pH und der Calciumionenkonzentration bestehende Korrelation. So spielen die Albuminkonzentration, Änderungen in der Bikarbonat- und Laktatkonzentration sowie des Plasmawasser-Anteils eine nicht unbedeutende Rolle (273). Das von uns unter in vitro-Bedingungen ermittelte Ausmaß der pH-bedingten Änderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums weist eine gute Übereinstimmung mit anderen Angaben für das Vollblut auf (68, 69, 273, 274).

Unter in vivo-Bedingungen (Hyperventilation) wurde ein geringeres Ausmaß an Änderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums bedingt durch Verschiebungen des pH-Wertes beobachtet. Ähnliches wurde auch bereits von THODE et al. (1983) berichtet.

Der Gesamtcalciumgehalt und der Proteingehalt des Blutes wurden durch die Hyperventilation nicht meßbar beeinflußt. Ähnliches hatten auch bereits FUCHS (1974) und THODE et al. (1983) bei ihren Hyperventilationsstudien beobachtet. Aus den vorliegenden Angaben wird deutlich, daß die in verschiedenen Ca^{++}-Analyzern durchgeführte Korrektur der Konzentration des ionisierten Calciums auf einen pH-Wert von 7,4 unter Einbeziehung eines Koeffizienten von -0,24 nur für in vitro-Bedingungen gelten kann. Diese Korrektur bietet jedoch die Möglichkeit, bei der Bestimmung des ionisierten Calciums im Routinebetrieb auftretende aerobe Verhältnisse auszugleichen.

Normalwertbereich von Gesamtcalcium und ionisiertem Calcium:

Der von uns ermittelte Gesamtcalciumgehalt im Serum und dessen Schwankungsbreite zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den Angaben anderer Autoren (Abbildung 14). Ähnlich wie bereits PASCHEN (1975) ermittelten wir bei den weiblichen Probanden einen niedrigeren, jedoch nicht signifikanten Gesamtcalciumspiegel als bei den männlichen. Über signifikant höhere Konzentrationen des Gesamtcalciums bei

Männern wurde berichtet (19, 107, 118). Demgegenüber konstatierten HATTNER et al. (1970) und SEAMONDS et al. (1972) keinerlei geschlechtsspezifische Unterschiede im Gehalt des Gesamtcalciums. Eine Altersabhängigkeit des Gesamtcalciumgehaltes, wie sie von anderen Autoren festgestellt wurde (10, 118, 139), war bei unseren und anderen Untersuchungen ebenfalls nicht ersichtlich (101, 270, 285, 296).

Die mit den einzelnen Elektrodentypen gemessenen Mittel- und Normbereichswerte stimmen gut mit den von anderen Autoren gemachten Angaben überein (Abb 16). Die Ergebnisse machen deutlich, daß der erhaltene Normalwertbereich eine starke Abhängigkeit von dem jeweils eingesetzten Elektrodentyp aufweist. Auffällig ist ebenfalls, daß die mit Elektroden neuerer Generation ermittelten Werte eine geringere Streubreite aufweisen. Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß die heute eingesetzten Elektroden eine höhere Spezifität und Präzision besitzen.

So wurden im Serum und auch im Vollblut mit dem ORION SS-20 die niedrigsten und mit dem NOVA 2 die höchsten Normwertbereiche für die Konzentration des ionisierten Calciums gemessen.

In der Konzentration des ionisierten Calciums im Serum konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Personen gesehen werden. Dies stimmt gut mit den Angaben anderer Autoren überein (19, 37, 69, 69, 101, 106, 107, 136, 146, 185, 200, 251, 270).

Es wurde jedoch auch bereits über signifikant höhere Konzentrationen des ionisierten Calciums im Serum bei Männern berichtet (126, 138, 139, 300).

Zwischen der Konzentration des Gesamtcalciums und der des ionisierten Calciums im Serum konnten wir ähnlich wie bereits andere Autoren keine engere Korrelation feststellen (101, 126, 139, 153, 163, 164, 185, 209).

Auch in der Größe des Ionisationsgrades kam die Abhängigkeit von der eingesetzten Elektrode zur Bestimmung des ionisierten Calciums zum Ausdruck. Unsere durchschnittlichen Werte von 48,7; 50,4 und 51,7 % für den Ionisationsgrad des Gesamtcalciums im Serum stimmen mit den Angaben zahlreicher Autoren überein. Die Angaben zum prozentualen Anteil des ionisierten Calciums am Gesamtcalcium schwanken in der Literatur zwischen 40,3 und 60,1 % (79, 96, 101, 136, 230).

Bei einem Vergleich der ermittelten Konzentrationen des ionisierten Calciums im Serum und Vollblut ist zu erkennen, daß die im Vollblut mit allen Systemen gemessenen Werte durchschnittlich um 0,02 bis 0,04 $mmol \cdot l^{-1}$ niedriger liegen als im Serum.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bereits von anderen Arbeitsgruppen gemacht (37, 52, 260, 274).

Dieser Unterschied in der Konzentration des ionisierten Calciums in Serum- und Vollblutproben kann zum Teil auf die Anwesenheit von Heparin in den Blutproben zurückgeführt werden. Daß es durch Heparinzusatz zu einer konzentrationsabhängigen Erniedrigung des ionisierten Calciums im Blut kommt, konnte durch unsere Untersuchungsergebnisse und durch die Resultate anderer Autoren eindeutig gezeigt werden (14, 19, 48, 73, 106, 126, 133, 164, 179, 194, 220, 275).

Während die meisten Autoren erst ab einer Heparinkonzentration von über 20 I.E. pro ml Blut einen signifikanten Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums feststellen konnten, wurde von BISWAS et al. (1981) und auch von uns ein deutlicher Abfall der Konzentration des ionisierten Calciums bereits bei wesentlich geringeren Heparinkonzentrationen beobachtet.

Der durch die Heparinapplikation bedingte Abfall der Calciumionenkonzentration wird bei der Messung mit ionenselektiven Elektroden im Vollblut nicht immer in seinem wahren Ausmaß erfaßt, da seitens der Erythrozyten eine positive

Verfälschung der Messung stattfinden kann (13, 66, 148, 257, 262).

Da in der Literatur nur wenig Angaben über die Konzentration des ionisierten Calciums zu finden waren, stellten wir uns die Aufgabe, den Gesamtcalciumgehalt und die Calciumionenkonzentration im Liquor und im Blut vergleichend zu untersuchen. Dabei wurde von uns festgestellt, daß der Gesamtcalciumgehalt im Liquor mit durchschnittlich 1,15 $mmol \cdot l^{-1}$ deutlich unter dem im Blut liegt. Die von uns ermittelten Werten stimmen dabei gut mit den Angaben von FUCHS (1974) und GOLDSTEIN et al. (1979) überein.

Auch die Konzentration des ionisierten Calciums lag mit durchschnittlich 0,90 mmol·1 deutlich unter der im Blut gemessenen.

Die Konzentration des ionisierten Calciums war bei uns geringfügig höher als bei FUCHS (1974) und deutlich höher als bei GOLDSTEIN et al. (1979).

Ein Teil der gefundenen Unterschiede in der Calciumionenkonzentration (Absolutwerte) ist sicherlich auch hier auf den unterschiedlichen Meßbereich (Empfindlichkeit) der von den verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzten ionenselektiven Elektroden zurückzuführen.

Diese Annahme wird auch dadurch bestärkt, daß die ermittelten Liquor-Serum-Quotienten für das ionisierte Calcium bei FUCHS (1974) 0,73, bei GOLDSTEIN et al. (1979) 0,67, bei MURE und BLUM (1968) 0,73 und bei den eigenen Untersuchungen 0,73 betrugen und somit eine ausgezeichnete Übereinstimmung sichtbar wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die wesentlichsten in der Literatur erwähnten und beschriebenen Methoden zur Bestimmung der verschiedenen Calciumfraktionen systematisch aufgeführt und kritisch betrachtet. Eine besondere Berücksichtigung finden dabei die Analytik des ionisierten Calciums, die zwischen den einzelnen Fraktionen des Calciums im Blut bestehenden Interaktionen und ihre physiologischen Funktionen. Es wird die Abhängigkeit, besonders der ionisierten Fraktion, des Calciums im Blut von verschiedenen physiologischen und methodischen Faktoren im Rahmen einer ausführlichen Literaturübersicht aufgezeigt.

Die Analyse des Gesamtcalciums erfolgte mit Hilfe der Atomabsorption und die des ionisierten Calciums mittels ionenselektiver Elektroden.

Es wurde gezeigt, daß die heute eingesetzten Systeme zur Analyse der Konzentration des ionisierten Calciums (ORION SS-20, AVL 980, NOVA 2 und 8, ICA1) gut reproduzierbare Meßwerte liefern. Die mit den einzelnen Analyzern gemessenen Konzentrationen des ionisierten Calciums im Serum und Vollblut unterscheiden sich teilweise signifikant und weisen auf ein unterschiedliches Ausmaß an Interferenzen in diesen Medien auf die eingesetzten ionenselektiven Elektroden hin.

Die Konzentration des ionisierten Calciums im Blut unterliegt einer starken Abhängigkeit von verschiedenen präanalytischen Faktoren. So konnte aufgezeigt werden, daß durch eine Venostase (3 Minuten, 100 mm Hg) Veränderungen in der Blutzusammensetzung induziert werden. Eine gleichzeitige aktive Bewegung der gestauten Extremität führt zu einer signifikanten Verfälschung der zu messenden Calciumionenkonzentration.

Heparinzusatz bewirkt im Vollblut eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Calciumionenkonzentration. Dieser ne-

gative Effekt des Heparins kann durch $CaCl_2$-Zusatz (3×10^{-3} mmol·l^{-1}) zur Heparinlösung ohne wesentliche Verfälschung der Meßwerte aufgehoben werden.

Eine Lagerung der Proben sollte bei 4°C erfolgen. Unter diesen Bedingungen können sowohl Vollblut- als auch Liquorproben 8 Stunden ohne nachweisbare Veränderungen in der Konzentration des ionisierten Calciums gelagert werden.

Die Konzentration des ionisierten Calciums weist zum pH-Wert des Blutes eine inverse Korrelation auf. Das Verhältnis $\lg c_{Ca^{++}} / pH$ beträgt dabei unter in vitro-Bedingungen -0,22 und -0,15 unter in vivo-Bedingungen.

Zur Festlegung von Normalwert und Normalwertbereichen ist die Einhaltung von Standardbedingungen für die Blutentnahme zur Reduzierung bzw. Vermeidung störender präanalytischer Faktoren auf die Bestimmung der Konzentration des ionisierten Calciums unumgänglich. Der Normalwert und Normalwertbereich im Blut waren für das Gesamtcalcium:

$$2{,}38 \pm 0{,}09 \text{ mmol} \cdot l^{-1} \text{ und } 2{,}20 - 2{,}56 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$$

und für das ionisierte Calcium bei der Bestimmung mit dem

ORION SS-20	$1{,}12 \pm 0{,}05$ mmol·l^{-1}	und 1,02 - 1,22 mmol·l^{-1}
AVL 980	$1{,}18 \pm 0{,}05$ mmol·l^{-1}	und 1,08 - 1,28 mmol·l^{-1}
NOVA 2	$1{,}21 \pm 0{,}05$ mmol·l^{-1}	und 1,11 - 1,31 mmol·l^{-1}

Die Werte für die Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut waren im Durchschnitt um 0,02 - 0,04 mmol·l^{-1} niedriger als im Serum.

Im Serum konnte mit den eingesetzten Analyzern ein durchschnittlicher Ionisationsgrad von 48,7 - 51,7 % ermittelt werden.

Die Konzentration des ionisierten Calciums unterliegt im Vollblut einer Normalverteilung und weist mit dem Gesamtcalcium keine engere Korrelation auf.

Der Normalwert und Normalwertbereich im Liquor cerebrospinalis waren für das Gesamtcalcium:

$1,15 \pm 0,06$ mmol·l^{-1} und 1,03 - 1,27 mmol·l^{-1}

und für das ionisierte Calcium bei der Bestimmung mit dem NOVA 2 $0,90 \pm 0,04$ mmol·l^{-1} und 0,82 - 0,98 mmol·l^{-1}.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGUS, Z.S., A. WASSERSTEIN, S. GOLDFARB
Disorders of calcium and magnesium homeostasis.
Amer. J. Med. 72, 473-476 (1982)

2. AITKEN, J.M., R. LINDSAY
The physiological regulation of the seasonal variations in phosphorus and calcium metabolism.
J. Physiol. (London) 226, 93-96 (1972)

3. AMADOR, E., W.E. NEELEY
Automated serum calcium analysis corrected for dialysis effects.
Amer. J. clin. Path. 58, 707-717 (1972)

4. AMMAN, D., M. GÜGGI, E. PRETSCH, W. SIMON
Improved calcium ion-selective electrode based on a neutral carrier.
Anal. Lett. 8, 709-720 (1975)

5. ANDERSON, N.F.
Albumin/calcium association at different pH, as determined by potentiometry.
Clin. Chem. 23, 2122-2126 (1977)

6. ANKER, P., E. WIELAND, D. AMMAN, R.E. DOHNER, R.A. ASPER, W. SIMON
Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of total calcium in blood serum.
Anal. Chem. 53 1970-1974 (19871)

7. ARIEFF, A.E., S.G. MASSRY
Calcium metabolism of brain in acute renal failure. Effects of uremia, hemodialysis and parathyroid hormone.
J. clin. Invest. 53, 387-392 (1974)

8. BAGINSKI, E.S., S.S. MARIE, W.L. CLARK, B. ZANK
Direct microdetermination of serum calcium.
Clin. Chim. Acta 46, 46-54 (1973)

9. BAND, D.M., J.W. BROADWAY
Some effects of pH on plasma calcium in the human and cat.
J. Physiol. (London) 289, 38P (1979)

10. BAUDITZ, W.
Der Plasmacalciumwert beim Menschen und seine Altersabhängigkeit.
Z. ges. exp. Med. 142, 9-21 (1967)

11. BERRY, E.M., M.M. GUPTA, S.J. TURNER, R.R. BURNS
Variation in plasma calcium with induced changes in plasma specific gravity, total protein, and albumin.
Br. Med. J. 4, 640-643 (1973)

12. BESARAB, A., A. DECUZMAN, J.W. SWANSON
Effect of albumin and free calcium concentrations on calcium binding in vitro.
J. clin. Pathol. 34, 1361-1367 (1981)

13. BIJSTER, P., H.L. VADER, C.L.J. VINK
The influence of erythrocytes on the direct potentiometric determination of sodium and potassium.
Ann. Clin. Biochem. 20, 146-152 (1983)

14. BISWAS, C.K., J.M. RAMOS, D.N.S. KERR
Heparin effect on ionized calcium concentration.
Clin. Chim. Acta 116, 343-347 (1981)

15. BÖNING, D., U. SCHWEIGART, M. KUNZE
Diurnal variations of protein and electrolyte concentrations and of acid-base status in plasma and red cells of normale man.
Europ. J. appl. Physiol. 22, 239-250 (1974)

16. BOINK, A.B.T.J., J.A. GIMPEL, A.H.J. MAAS
A comparison of four Ca^{++}-analyzers.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 17-19 (1983)

17. BOOTH, M.D., B. FLEET, S. WIN, T.S. WEST
Investigation of some continous voltametric sensors for the determination of calcium in the presence of magnesium.
Anal. Chim. Acta 48, 329-337 (1969)

18. BOWEN, H.J.M.
The elementary composition of mammalian blood.
U.K.A.E.A. Research Group, Isotope Res. Div. AERE-R 4196 (1963)

19. BRAUMAN, J., CH. DELVIGNE, I. DECONINCK, D. WILLEMS
Factors affecting the determination of ionized calcium in blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 27-31 (1983)

20. BREEN, M., S. FREEMAN
The use of high centrifugal force in separating plasma calcium into its protein-bound and protein-free fractions.
Clin. Chim. Acta 6, 181-187 (1961)

21. BRICKER, N.S., E. SLATOPOLSKY, E. REISS, L.V. AVIOLI
Calcium, Phosphorus and bone in renal disease and transplantation.
Arch. Int. Med. 123, 543-553 (1969)

22. BRISCOE, A.M., C. REGAN
Dissimilar distribution of calcium isotopes in blood serum and urine.
J. appl. Physiol. 20, 453-458 (1965)

23. BRISCOE, A.M., C. RAGAN
Coated charcoal assay of serum calcium fractions.
J. Lab. and Clin. Med. 69, 351-356 (1967)

24. BRISTOW, M., H.D. SCHWARTZ, G. BINETTI, D.C. HARRISON, J.R. DANIELS
Ionized calcium and the heart-elucidation of in vivo concentration-response relationship in the open-chest dog.
Circ. Res. 41, 565-574 (1977)

25. BRUNE, D., B. FRYKBERG, K. SAMSAHL, P.O. WESTER
Determination of elements in normal and leukemic human, whole blood by neutron activation analysis.
AB Atomenergi, Stockholm AE-60 (1961)

26. BRUUN, F.
Ioniseret calcium og hyperparathyreoidisme.
Thesis, FADL's FORLAG, Copenhagen (1980)

27. BUCKLEY, B.M., S.C.H. SMITH, D.A. HEATH, A.M. BOLD
Clinical studies on ionized calcium using the Radiometer ICA1 Analyzer.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 87-92 (1983)

28. BUTLER, S.J., R.B. PAYNE
Nova 2 ionized calcium analyzer: Imprecision, bias, and protein interference.
Clin. Chem. 29, 585-586 (1983)

29. CAMMANN, K.
Fortschritte auf dem Gebiet der ionensensitiven Elektroden.
Naturwissenschaften 57, 298-304 (1970)

30. CAMMANN, K.
Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden.
In: Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis. Bd. XIII, Hrsg. BOSCHKE, F.L., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1973)

31. CARE, A.D., L.M. SHERWOOD, J.T. POTTS, G.D. AURBACH
Perfusion of isolated parathyroid gland of the goat and sheep.
Nature (London) 209, 55-57 (1966)

32. CARR, C.W.
Studies on binding of small ions in protein solution with the use of membrane elctrodes.
II. The binding of calcium ions in solutions of bovine serum albumin.
Arch. Biochem. Biophys. 43, 147-156 (1953)

33. CHAM, B.E.
A semi-automated method for the estimation of ionic calcium activity and concentration in biological solutions.
Clin. Chim. Acta 37, 5-11 (1972)

34. CHRISTIANSEN, C., J. NAESTOFF, E.F. HVIDBERG
An easy procedure for in vivo estimation of protein binding and correction of elevated serum values induced by venous stasis.
Clin. Chim. Acta 62, 65-71 (1975)

35. CLARK, A.J., J.B. COLLIP
A study of the TISDALL-method for determination of blood serum calcium with a suggested modification.
J. biol. Chem. 63, 461-464 (1925)

36. CLARK, A.J., G.h. PERCIVAL, C.P. STEWART
Action of calcium ions on the frog's heart.
J. Physiol. (London) 66, 346-355 (1928)

37. CONCEICAO, S.C., F. WARD, F. ALVOREZ-UDE, P. ALZAMA, P. SMITH, D.N.S. KERR
Determination of serum ionized calcium by ion exchange electrode in normal subjects.
Clin. Chim. Acta 86, 143-151 (1978)

38. COPP, D.H., B. CHENEY, N.M. STOKOE
Simple and precise micromethod for EDTA titration of calcium.
J. Lab. and Clin. Med. 61, 1029-1037 (1963)

39. CREMER, M.
Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten.
Z. Biol. 47, 562-608 (1906)

40. DALE, N.E., G.M. KELLERMAN
The binding of calcium by the plasma proteins in hyperparathyroidism.
Clin. Sci. 32, 433-442 (1967)

41. D'COSTA, M., P.-T. CHENG
Ultrafiltrable calcium and magnesium in ultrafiltrates of serum prepared with the Amicon MPS-1 system.
Clin. Chem. 29, 519-522 (1983)

42. DE LUCA, H.F., C. ANAST
Pediatric diseases related to calcium.
Elsevier, New York 11-57 (1980)

43. DENLINGER, J.K., M.L. NAHRWOLD, P.S. GIVVS, J.H. LECKY
Hypocalcemia during rapid blood transfusion in anaesthetized man.
Br. J. Anaesth. 48, 995-999 (1976)

44. DENSON, J.R.
Flame photometric determination of electrolytes in tissue and of calcium in serum.
J. biol. Chem. 209, 233-240 (1954)

45. DENT, C.E.
Some problems with hyperparathyroidism.
Br. Med. J. 2, 1419-1425 (1962)

46. DE RAEDT, M., N. PORTIER, L. BRASSEUR, K.P. van de WOESTIJNE
Effect of red blood cell concentration on blood pH.
J. appl. Physiol. 26, 469-471 (1969)

47. DIXON, M., C.R. PATERSON
Posture and the composition of plasma.
Clin. Chem. 24, 824-826 (1978)

48. DROP, L.J., C. FUCHS, P.M. STULZ
Determination of blood ionized calcium in a large segment of the normal adult population.
Clin. Chim. Acta 89, 503-510 (1978)

49. DROP, L.J., G.A. GEFFIN, D.D. O'KEEFE
The relationship between ionized calcium concentration and ventricular pump performance in the dog under hemodynamically controlled conditions.
Am. J. Cardiol. 47, 1041-1052 (1981)

50. DROP, L.J., M.B. LAVER
Low plasma ionized calcium and response to calcium therapy in critically ill man.
Anesthesiology 43, 300-306 (1975)

51. DROP, L.J., D. SCHEIDEGGER
Haemodynamic consequences of citrate infusion in the anaesthetized dog. Comparison between two citrate solutions and the influence of beta blockade.
Br. J. Anaesth. 51, 513-521 (1979)

52. DROP, L.J., L.N. TOCHKA, D.R. MISANO
Comparative evaluation of two calcium ion-selective electrode systems, and their utility for monitoring steady-state changes in $|\ Ca^{++}\ |$.
Clin. Chem. 28, 129-133 (1982)

53. DUNCAN, P.H., M.R. WILLS, B.J. SMITH, J. SAVORY
Clinical studies of protein-bound calcium in various diseases.
Clin. Chem. 28, 672-675 (1982)

54. DURST, R.A.
Ion-selective electrodes.
National Bureau of Standards, Washington (1969)

55. ECKFELDT, J., D.F. KOEHLER
Measurement of ultrafiltrable calcium in serum with use of the Worthington ultrafree anticonvulsant drug filter.
Clin. Chem. 26, 1871-1873 (1980)

56. EISENMAN, G.
Glass electrodes for hydrogen and other cations. Principles and practice. New York (1967)

57. EISENMAN, G.
Theory of membrane electrode potentials: an examination of the parameters determining the selectivity of solid and liquid ion exchangers and of neutral ionsequestering molecules.
In: Ion-selective electrodes. Ed. DURST, R.A., National Bureau of Standards, Washington, 1-56 (1969

58. EISENMAN, G., D.O. RUDIN, J.U. CASLEY
Glass electrode for measuring sodium ion.
Science 126, 831-834 (1957)

59. ETTORI, J., S.M. SOGGAN
A determinatioin of ionized calcium in serum by two-wavelength spectrophotometry of a metal indicator.
Clin. Chim. Acta 6, 861-865 (1961)

60. FALES, F.W.
A micromethod for the determination of serum calcium.
J. biol. Chem. 204, 577-585 (1953)

61. FANCONI, A., G.A. ROSE
The ionized, complexed, and protein-bound fractions of calcium in plasma.
Quart. J. Med. 327, 463-494 (1958)

62. FARESE, G., M. MAGER, W.F. BLATT
A membrane ultrafiltration procedure for determining diffusible calcium in serum.
Clin. Chem. 16, 226-228 (1970)

63. FAWCETT, J.K., V. WYNN
Effects of posture on plasma and some blood constitutents.
J. clin. Pathol. 13, 304-310 (1963)

64. FEISTEL, C.C., G. MATSUYAMA, A. WILCOX
Comparison of free calcium ion and pH measurement in aerobic and anaerobic whole blood samples.
Clin. Chem. 28, 1631-1638 (1982)

65. FERGUSON, E., A. VAUGHAN, J. SWALE
A method for the estimation of total calcium in serum or heparinized plasma.
Clin. Chim. Acta 67, 281-286 (1976)

66. FERREIRA, P., A.M. BOLD
Clinical laboratory evaluation of the Orion-SS-20 ionized calcium analyzer.
J. Auto. Chem. 1, 94-102 (1979)

67. FINSTERER, U., J. BETZ, S. BRAUN, A. BEYER, U. JENSEN, W. KELLERMAN
Metabolism of phosphate and calcium after severe accidential trauma.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43 Suppl. 165, 117-122 (1983)

68. FOGH-ANDERSEN, N.
Ionized calcium analyzer with a built-in pH correction.
Clin. Chem. 27, 1264-1267 (1981)

69. FOGH-ANDERSEN, N., T.F. CHRISTIANSEN, L. KOMARMY, O. SIGGAARD-ANDEERSEN
Measurement of free calcium ion in capillary blood and serum.
Clin. Chem. 24, 1545-1552 (1978)

70. FOURNIER, A.E., C.D. ARNAUD, W.J. JOHNSON, W.F. TAYLOR, R.S. DOLDSMITH
Etiology of hyperparathyroidism and bone disease during chronic hemodialysis. II. Factors affecting serum immunoreactive parathyroid hormone.
J. Clin. Invest. 50, 599-605 (1971)

71. FOWLER, D.I., D.J. FONE, W.T. COOKE
The calcium fractions of plasma in hypercalcaemic conditions and in adult coeliac disease.
Lancet II, 284 (1961)

72. FRIEDMAN, Z.W., B. HANLEY, I.C. RADDE
Ionized calcium in exchange transfusion with THAM-buffered ACD blood.
Can. Med. Assoc. J. 107, 742-745 (1972)

73. FUCHS, C.
Direkt-potentiometrische Meßverfahren zur Elektrolytbestimmung in biologischen Flüssigkeiten.
Habilschrift, Georg-August-Universität zu Göttingen (1974)

74. FUCHS, C.
Ion-selective electrodes in clinical medicine.
In: Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine.
Ed. KESSLER, M., Urban und Schwarzenberg, 389-397 (1976)

75. FUCHS, C.
Ionenselektive Elektroden in der Medizin.
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

76. FUCHS, C.
Die Bestimmung des ionisierten Calciums mit dem Nova 2-Analysator im klinischen Labor.
Med. Labor. 34, 108-111 (1981)

77. FUCHS, C., D. DORN, C. McIntosh, F. Scheler
Comparative calcium ion determinations in plasma and whole blood with a new calcium ion analyzer.
Clin. Chim. Acta 67, 99-102 (1976)

78. FUCHS, C., K. PASCHEN
Die Bestimmung des ionisierten Calciums im Serum mit Hilfe einer ionen-selektiven Elektrode.
Dtsch. Med. Wschr. 97, 23-24 (1972)

79. FUCHS, C., K. PASCHEN, P.G. SPIECKERMANN, C.v. WESTBERG
Bestimmung des ionisierten Calciums im Serum mit einer ionenselektiven Durchflußelektrode: Methodik und Normalwerte.
Klin. Wschr. 50, 824-832 (1972)

80. GALLATI, H.
Zum Verständnis des photometrischen Calcium-Tests mit Methylthymolblau.
Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 248-257 (1975)

81. GARDNER, M.D., F.J. DRYBURGH, J.A. FYFFE
Predictive value of derived calcium figures based on the measurement of ionized calcium.
Ann. Clin. Biochem. 18, 106-109 (1981)

82. GEORGE, W.K., W.D. GEORGE, J.P. SMITH, W.T. GORDON, E.F. BAIRD, G.C. MILLS
Changes in serum calcium, serum phosphate and red cell phosphate during hyperventilation.
N. Engl. J. Med. 270, 726-729 (1964)

83. GERBRANDY, J., A.M. VAN LEEUWEN, H.B.A. HELLENDORN, L.A. DE VRIES
The binding between electrolytes and serum proteins calculated from an in vivo filtration method.
Clin. Sci. 19, 181-193 (1960)

84. GIESE, W., C.L. COMAR
Existence of non-exchangeable calcium compartments in plasma.
Nature (London) 202, 31-33 (1964)

85. GITELMAN, H.J.
An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimen.
Anal. Biochem. 18, 521-531 (1967)

86. GOLDSTEIN, D.A., M. ROMOFF, E. BOGIN, S.G. MASSRY
Relationship between the concentrations of calcium and phosphorus in blood and cerebrospinal fluid.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49, 58-62 (1979)

87. GOSLING, P., B.H. ROBINSON, H.G. SAMMONS
Changes in protein-bound calcium in the serum of haemodialysis patients.
Clin. Sci. Mol. Med. 48, 521-528 (1975)

88. GREENWALD, I.
The effect of administration of calcium salts and of sodium phosphate upon the calcium and phosphorus metabolism of thyroparathyroidectomized dogs, with a consideration of the nature of the calcium compounds of blood and their relation to the pathogenesis of tetany.
J. biol. Chem. 67, 1-28 (1926)

89. GRIMA, J.M., M. BRAND
Activity and interference effects in measurement of ionized calcium with ionselective electrodes.
Clin. Chem. 23, 2048-2054 (1977)

90. GÜNTHER, F., W. HEUBNER
Calciumwirkung und Calciumionen.
Klin. Wschr. 3, 789-790 (1924)

91. GUPTA, G.S.
Effect of pH and carbon dioxide on calcium interactions in human plasma.
Indian. J. Biochem. 4, 188-189 (1967)

92. GYLLENSWÄRD, C., B. JOSEPHSON
The development of the serum electrolyte concentration in normal infants and children.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 9, 21-28 (1957)

93. HALVER, B.
Rapid method of determining ultrafiltrable calcium in serum.
Clin. Chem. 18, 1488-1492 (1972)

94. HANNA, E.A., H.O. NICHOLAS, I.A. CHAMBERLIN
Nomogram for estimating diffusible calcium.
Clin. Chem. 10, 235-240 (1964)

95. HANSEN, C.A., K. ENGEL, P. KILDEBERG, S. WAMBERG
An improved procedure of serum ionized calcium.
Clin. Chim. Acta 79, 507-511 (1977)

96. HANSEN, S.O., L. THEODORSEN
The usefulness of an improved calcium electrode in the measurement of ionized calcium in serum.
Clin. Chim. Acta 31, 119-122 (1971)

97. HARDY, M.J.
Estimation of free calcium by nomogram: A retrospective study on a new population.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Supl. 165, 65-70 (1983)

98. HARGIS, G.K., C.G. SIDWELL, B.L. JACKSON, G.A. WILLIAMS
An ultramicromethod for serum calcium determination.
Amer. J. clin. Pathol. 52, 773-775 (1969)

99. HARNACH, F., T.B. COOLIDGE
Determination of ionized calcium in serum with murexide.
Anal. Biochem. 6, 477-485 (1963)

10. HATTINGBERG, H.M., W. KLAUS
Trennung des proteingebundenen vom frei diffusiblen Calcium im Serum durch Sephadex.
Klin. Wschr. 44, 499-503 (1966)

101. HATTNER, R.S., J.W. JOHNSON, D.S. BERNSTEIN, A. WACHMAN
Elektrochemical determination of apparent ionized serum calcium using a calcium-selective electrode. The method and values in normal humans and a comparison to the total serum calcium.
Clin. Chim. Acta 28, 67-75 (1970)

102. HEATH, H., J.M. EARLL, M. SCHAAF, J.T. PIECHOCKI, T.K. LI
Serum ionized calcium during bed rest in fracture patients.
Metabolism 21, 633-640 (1972)

103. HEIDLAND; A., K. KLÜTSCH, H. HOCHREIN
Pseudohypocalcämie im heparinisierten Blut.
Klin. Wschr. 30, 51-53 (1961)

104. HILD, I.R., D. FREEMAN
Binding of calcium by human plasma proteins under simulated physiologic conditions.
J. appl. Physiol. 19, 292-297 (1964)

105. HUMPHREY, K.R., H.D. GRUEMER, J.A. LOTT
Impact of posture on the "reference range" for serum proteins and calcium.
Clin. Chem. 23, 1343-1346 (1977)

106. HUSDAN, H., M. LEUNG, D. OREOPOULOS, A. RAPAPORT
Measurement of serum and plasma ionic calcium with the "Space Stat 20 Ionized Calcium Analyzer".
Clin. Chem. 23, 175-177 (1977)

107. HUSDAN, H., A. RAPOPORT, S. LOCKE
Influence of posture on the serum concentration of calcium.
Metabolism 22, 787-797 (1973)

108. HUSDAN, R., A. RAPOPORT, S. LOCKE, D. OREOPOULOS
Effects of venous occlusion of the arm on the concentration of calcium in serum and methods for its compensation.
Clin. Chem. 20, 529-532 (1974)

109. IMMICH, H.
Medizinische Statistik.
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York (1974)

110. ISHIDA, M., Y. SEINO, K. YAMAOKA, Y. TANAKA, K. SATOMURA, Y. KUROSE, H. YABUNCHI
The circadian rhythms of blood ionized calcium in humans.
Scand. J.clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 83-86 (1983)

111. IZUTSU, K.T., S.P. FELTON
Plasma calcium assay, with use of the jellyfish protein, Aequorin as a reagent.
Clin. Chem. 18, 77-79 (1972)

112. JACKLYN, C.L., C.D. FREEMAN, E. GRAY, M.A. MacAULAY
Determination of serum calcium by use of an auto analyzer I-II Hybrid.
Clin. Chem. 19, 516-520 (1973)

113. JAFFE, J.P., D.F. MOSHER
Calcium binding by a myeloma protein.
Amer. J. Med. 67, 343-346 (1979)

114. JONES, J.D., W.F. McGUCKIN
Complexometric titration of calcium and magnesium by semiautomated procedure.
Clin. Chem. 10, 767-770 (1964)

115. JUBIZ, W., J.M. CANTERBURY, E. REISS, F.H. TYLER
Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: Correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels.
J. Clin. Invest. 51, 2040-2046 (1972)

116. JUNGE, B., H. HOFFMEISTER, H.M. FEDDERSEN; L. RÖCKER
Standardisierung der Blutentnahme: Einfluß der Stauung auf 33 Blut- und Serumbestandteile.
Dtsch. Med. Wschr. 103, 260-265 (1978)

117. KAHN, R.C., D. JASCOTT, G.C. CARLON, O. SCHWEIZER, W.S. HOWLAND, P.L. GOLDINER
Massive blood replacement: correlation of ionized calcium, citrate and hydrogen ion concentration.
Anesth. Analg. (Cleveland) 58, 274-278 (1979)

118. KELLY, A., L. MUNAN, C.P. CLERC, K.P. HO, B. BILLON
Use of values for calcium and protein in serum, and of a derived index obtained from a probability population sample.
Clin. Chem. 22, 1723-1726 (1976)

119. KESSLER, G., M. WOLFMAN
An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus.
Clin. Chem. 10, 686-703 (1964)

120. KLINKE, K.
Neuere Ergebnisse der Calciumforschung.
Ergebn. Physiol. 26, 235-319 (1928)

121. KOELLMANN, U.T., J.W. NELSON
Ionized calcium (Ca^{++}), sodium (Na^{+}) and potassium (K^{+}) simultaneously by electrode.
Clin. Chem. 24, 1062-1062 (1978)

122. KORYTA, J.
Theory and applications of ion-selective electrodes.
Analyt. Chim. Acta. 61, 329-411 (1972)

123. KOTZAUREK, R.
Über Erfahrungen mit neueren Untersuchungsmethoden bei Mineralstoffwechselstudien.
Arch. klin. Med. 213, 96-105 (1967)

124. KRAMER, B., F. TISDALL
A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum.
J. biol. Chem. 47, 475-481 (1921)

125. KRIPKE, D.F., P. LAVIE, D. PARKER, L. HUEY, L.J. DEFTOS
Plasma parathyroid hormone and calcium are related to sleep stape cycles.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 1021-1027 (1978)

126. LADENSON, J.H., G.N. BOWERS
Free calcium in serum. I. Determination with ion-specific electrode, and factors affecting the results.
Clin. Chem. 19, 565-575 (1973a)

127. LADENSON, J.H., G.N. BOWERS
Free calcium in serum. II. Rigor of homeostatic control, correlations with total serum calcium, and review of data on patients with disturbed calcium metabolism.
Clin. Chem. 19, 575-582 (1983b)

128. LADENSON, J.H., J.W. LEWIS, J.C. BOYD
Failure of total calcium corrected for protein, albumin, and pH to correctly assess free calcium status.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 986-993 (1978a)

129. LADENSON, J.H., J.W. LEWIS, J.M. McDONALD, E. SLAPOLSKY, J.C. BOYD
Relationship of free and total calcium in hypercalcemic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 481, 393-398 (1978b)

130. LADENSON, J.H., J.C. SHYONG
Influence of fatty acids on the binding of calcium to human serum albumin.
Clin. Chim. Acta. 75, 293-302 (1977)

131. LANDIS, E.M., J.R. PAPPENHEIMER
Exchange of substances through the capillary walls.
In: Handbook of Physiology, Circulation.
Amer. Physiol. Soc. Washington D.C., 961-997 (1961)

132. LARSSON, L., O. FINNSTRÖM, B. NILSSON, S. ÖHMAN
Evaluation of Radiometer ICA1 as a routine instrument for serum ionized calcium and its application for whole blood capillary samples from newborn infants.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 21-26 (1983)

133. LARSSON, L., S. ÖHMAN
Evaluation of the "Space Stat 20 Ionized Calcium Analyzer".
Clin. Chem. 24, 731-732 (1978)

134. LENGYEL, B., E. BLUM
The behaviour of the glass electrode in connection with its chemical composition.
Trans. Faraday Soc. 30, 461-470 (1934)

135. LEWIN, M.R., M.R. WILLS, D.N. BARON
Ultramicrofluorimetric determination of calcium in plasma.
J. clin. Path. 22, 222-225 (1969)

136. LI, T.K., J.T. PIECHOCKI
Determination of serum ionic calcium with an ionselective electrode: Evaluation of methodology and normal values.
Clin. Chem. 17, 411-416 (1971)

137. LIKINS; R.C., D.L. CRAVEN
An apparent difference in the renal clearance of calcium-45 and calcium-40 in rats.
Nature (London) 188, 592-593 (1960)

138. LINDGÄRDE, F.
Potentiometric determination of serum ionized calcium in a normal human population.
Clin. Chim. Acta 40, 477-482 (1972)

139. LINDGÄRDE, F., O. ZETTERVALL
Serum ionized calcium in a normal population studied with a calcium ion-sensitive electrode.
Isr. J. Med. Sci. 7, 510-513 (1971)

140. LJUNGHALL, S., H. HEDSTRAND, K. HELLSING; L. WIBELL
Calcium, phosphate and albumin in serum.
Acta Med. Scand. 201, 23-30 (1977)

141. LLOYD, H.M., G.A. ROSE
Ionized, protein-bound, and complexed calcium in the plasma in primary hyperparathyroidism.
Lancet 26, 1258-1261 (1958)

142. LOEB, R.F.
The effect of pure protein solutions and of blood serum on the diffusibility of calcium.
J. Gen. Physiol. 8, 451-461 (1926)

143. LOKEN, H.F., S.F. ARNAUD, S.J. REHFELD
Determination of ionized calcium with the Orion SS-20 and AMT Electrion Auto compared.
Clin. Chem. 24, 2066-2066 (1978)

144. LOKEN, H.F., R.J. HAVEL, G.S. GORDAN, S.L. WHITTINGTON
Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum.
J. biol. Chem. 235, 3654-3658 (1960)

145. LOMAX, G.D.
Determination of protein-bound magnesium and calcium by gel filtration.
J. med. Lab. Techn. 24, 103-112 (1967)

146. LOW, J.C., M. SCHAAF, J.M. EARLL, J.T. PIECHOCKI, T.K. LI
Ionic calcium determination in primary hyperparathyroidism.
JAMA 223, 152-155 (1973)

147. LUMB; G.A.
Determination of ionic calcium in serum.
Clin. Chim. Acta 8, 33-38 (1963)

148. MAAS, H.H.J.
pH determination of body fluids with a micro glass electrode and a saturated KCl-bridge in the cell.
Clin. Chim. Acta 28, 373-377 (1981)

149. MacFADYEN, I.J., B.E.C. NORDEN, D.A. SMITH, D.J. WAYNE, S.L. RAE
Effect of variation in dietary calcium on plasma concentration and urinary excretion of calcium.
Br. Med. J. 1, 161-164 (1965)

150. MacINTYRE, J.
The flamme-spectrophotometric determination of calcium in biological fluids and an isotopic analysis of errors in the Kramer-Tisdall procedure.
Biochem. J. 67, 164-172 (1957)

151. MADSEN; S., K. ØLGARD
Evaluation of a new automatic calcium ion analyzer.
Ann. Clin. Chem. 23, 690-694 (1977)

152. MALEKPOUR; A., D. TAYLOR, M.E. KING
Nova 2 ionized calcium analyzer: Evaluation, interference values.
Clin. Chem. 28, 7-7 (1982)

153. MAKOWITZ, M., L. ROTKIN, J.F. ROSEN
Circadian rhythms of blood minerals in humans.
Science 213, 672-674 (1981)

154. MARSHALL, R.W.
Practical and clinical aspects of serum ionized calcium measurements in a calcium metabolism unit.
In: Conf. on Med. Appl. of Electroanal. Chem., Newcastle, England, January (1980)

155. MARSHALL, R.W., A. HODGKINSON
Calculation of plasma ionized calcium from total calcium, proteins and pH: comparison with measured values.
Clin. Chim. Acta. 127, 305-310 (1983)

156. MASORO, E.J., B.P. YU
Involvement of protein components in calcium transport
Recent. Adv. Stud. Card. Struct. Metab. 4, 495-506 (1974)

157. McCARRON, D.A.
Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension.
N. Engl. J. Med. 307, 226-228 (1982)

158. McLEAN, F.C., A.B. HASTINGS
A biological method of estimation of serum calcium ion concentration.
J. biol. Chem. 107, 337-350 (1934)

159. McLEAN, F.C., A.B. HASTINGS
The state of calcium in the fluids of the body. I. The conditions affecting the ionisation of calcium.
J. biol. Chem. 108, 285-322 (1935a)

160. McLEAN, F.C., A.B. HASTINGS
Clinical estimation and significance of calcium ion concentration in the blood.
Amer. J. med. Sci. 189, 601-613 (1935b)

161. MOODY, G.J., R.B. OKE, J.D.R. THOMAS
A calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a poly-vinyl-chloride matrix.
Analyst 95, 910-917 (1970)

162. MOODY, G.J., J.D.R. THOMAS
Selective ion sensitive electrodes.
Merrow Co. Ltd., Watford-Herts (1971)

163. MOORE, E.W.
Studies with ion-exchange calcium electrodes: some applications in biomedical research and clinical medicine.
In: Symposium on Ion-Exchange Electrodes, Ed. DURST, R.
National Bureau of Standards, Gaithersburg, 215-286 (1969)

164. MOORE, E.W.
Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes.
J. clin. Invest. 49, 318-334 (1970)

165. MOORE, E.W.
Studies with ion-exchange electrodes. III. The state of serum calcium in patients with cirrhosis.
Gastroenterology, 60, 43-54 (1971)

166. MOORE, E.W., A.L. BLUM
Studies with ion exchange calcium electrodes: the distribution of ionized calcium between blood and cerebrospinal fluid (CSF) in man and dog.
J. clin. Invest. 47, 70 A (1968)

167. MORF; W.E., AMMANN, D.E. PRETSCH, W. SIMON
Carrier antibiotics and model compounds as components of selective ionsensitive electrodes.
Pure appl. Chem. 36, 421-429 (1973)

168. MORSE; E.E., D.C. HOHNADEL, P. GENCO, A.J. KATZ
Decrease ionized calcium during therapeutic plasma exchange pheresis and platlet pheresis.
John Hopkins Med. J. 146, 260-263 (1980)

169. MOSER; G.B., H.W. GERARDE
Fluorometric ultramicrodetermination of calcium in biologic fluids.
Clin. Chem. 25, 376-380 (1969)

170. MÜLLER-PLATHE, O., K. LINDEMANN
Ionized calcium versus total calcium.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 71-73 (1983)

171. NERNST, W.
Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper.
Z. phys. Chem. 3, 613-637 (1888)

172. NERNST, W.
Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen.
Z. phys. Chem. 4, 129-181 (1889)

173. NEUMAN, W.F., P.E. MORROW; T.Y. TORIBARA, L.J. CARARETT, B.J. MULRYAN, H.C. HODGE
Evidence for complex ion formation in the calcium bicarbonate system.
J. biol. Chem. 219, 551-555 (1956)

174. NEWSOME; F.E.
Automated fluorimetry for calcium in microsamples.
Clin. Biochem. 2, 465-467 (1969)

175. NIELSEN; S.P., T.F. CHRISTIANSEN; O. HARTLING; J. TRAP-JENSEN
Increase in serum ionized calcium during exercise.
Clin. Sci. Mol. Med. 53, 579-586 (1977)

176. ÖHMAN, S., L. LARSSON
Higher values for ionized calcium with a new type of electrode for Orion SS-20.
Clin. Chem. 24, 2070-2071 (1978)

177. OLINGER, G.N., C. HOTTENROTT, D.G. MULDER, J.V. MALONEY, J. MILLER; R.W. PATTERSON, S.F. SULLIVAN, G.D. BUCKBERG
Acute clinical hypocalcemic myocardial depression during rapid blood transfusion and postoperative hemodialysis a preventable complication.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 73, 503-511 (1976)

178. ORELL, D.H.
Albumin as an aid to the interpretation of serum calcium.
Clin. Chim. Acta 35, 483-489 (1971)

179. ORESKES, I., C. HIRSCH, K.S. DOUGLAS, S. KUPER
Measurement of ionized calcium in human plasma with a calcium selective electrode.
Clin. Chim. Acta 21, 303-313 (1968)

180. OSTWALD, W.
Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände.
Z. phys. Chem. 6, 71-82 (1890)

181. PAGE, J.H., M. MOINUDDIN
The effect of venous occlusion on serum cholesterol and total protein concentration. A warning.
Circulation 25, 651-652 (1962)

182. PAIN, R.W., K.M. ROWLAND; P.J. PHILLIPS; B.M. DUNCAN
Current "corrected" calcium concept challenged.
Br. Med. J. 4, 617-618 (1975)

183. PARFITT; A.M.
Study of parathyroid function in man by EDTA infusion.
J. clin. Endocrinol. 29, 569-577 (1969)

184. PASCHEN, K.
Eine neue Mikromethode zum spezifischen Nachweis von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium in einer einzigen Serumverdünnung.
Dtsch. Med. Wschr. 95, 2570-2573 (1970)

185. PASCHEN, K.
Die Bestimmung des Calciums und seiner Fraktionen im Serum.
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

186. PASCHEN, K.
Elektrolytbestimmung mittels ionenselektiver Elektroden.
Das Med. Labor. 34, 119-124 (1981)

187. PASCHEN, K., G. FRITZ
Neue Methoden zum empfindlichen und spezifischen Nachweis von Calcium, Magnesium und Zink im Serum mit der Atomabsorptions-Spektralphotometrie.
Ärztl. Forsch. 24, 202-209 (1970)

188. PASCHEN, K., P.G. SPIECKERMANN
Atomabsorptions-Spektralphotometrie.
Dtsch. Med. Wschr. 95, 2577-2581 (1970)

189. PAUPE, J.
Utilisation de coeur de crapaud pour le dosage biologique du calcium ionisé le sérum.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 149, 2103-2109 (1955)

190. PAYNE, R.B.
Clinically significant effect of protein concentration on ion-selective electrode measurements of ionized calcium.
Ann. Clin. Biochem. 19, 233-237 (1982)

191. PAYNE, R.B., A.J. LITTLE, R.B. WILLIAMS, J.R. MILNER
Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins.
Br. Med. J. 4, 643-646 (1973)

192. PEACOCK, M., F. KNOWLES, B.E.C. NORDIN
Effect of calcium administration and deprivation on serum and urine calcium in stone-forming and control subjects.
Br. Med. J. 2, 729-733 (1968)

193. PEDERSEN, K.O.
Determination of calcium fractions of serum. I. The separation of protein-bound and protein-free fractions by means of a simplified ultrafiltration technique.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 24, 69-81 (1969)

194. PEDERSEN, K.O.
Determination of calcium fractions in serum. II. Investigation of calcium ion acitivity and stability of important calcium complexes by an improved semimicro method.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 25, 198-208 (1970a)

195. PEDERSEN, K.O.
Determination of calcium fractions of serum. III. Ionized calcium in ultrafiltrates of normal serum and examination of pertinent variables.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 25, 223-230 (1970b)

196. PEDERSEN, K.O.
The effect of bicarbonate, pCO_2 und pH on serum calcium fractions.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 27, 145-150 (1971a)

197. PEDERSEN, K.O.
Binding of calcium to serum albumin. I. Stoichiometry and intrinsic association constant at physiological pH, ionic strength and temperature.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 28, 459-467 (1971b)

198. PEDERSEN, K.O.
Binding of calcium to serum albumin. II. Effect of pH via competitive hydrogen and calcium ion binding to the imidazole groups of albumin.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, 75-83 (1972a)

199. PEDERSEN, K.O.
Binding of calcium to serum albumin. IV. Effect of temperature and thermodynamics of calcium-albumin interaction.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 89-94 (1972b)

200. PEDERSEN, K.O.
On the cause and degree of intraindividual serum calcium variability.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 191-199 (1972c)

201. PEDERSEN, K.O.
Protein-bound calcium in human serum. Quantitative examination of binding and its variables by a molecular binding model and clinical chemical implications for measurement of ionized calcium.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 321-329 (1972d)

202. PEDERSEN, K.O.
The performance of the double membrane electrode in the clinical chemical laboratory.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 35, 57-58 (1975)

203. PEDERSEN, K.O., O. JUHL
Blood ionized calcium measurements during aortocoronary bypass graft operations.
Scand. J. clin. Lab. Invedst. 43, Supl. 165, 107-109 (1983)

204. PETERSON, N.A., G.A. FEIGEN, J.M. CRISMON
Effect of pH on interaction of calcium ions with serum proteins.
Amer. J. Physiol. 201, 386-392 (1961)

205. PILZ, D., H. KÖHLER; W. ROTZSCH
Simultanbestimmung des freien und des Gesamtkalziums im Serum mit einer automatisierten kolorimetrischen Methode.
Z. med. Labor. Diagn. 320, 348-353 (1979)

206. PIRKE, K.M., D. STAMM
Die Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium im Harn mit einem Filterflammenphotometer.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8, 241-248 (1970)

207. PITKIN, R.M., M.P. GEBHARDT
Serum calcium concentrations in human pregnancy.
Amer. J. Obstet. Gypecol. 127, 775-778 (1977)

208. PITKIN, R.M., W.A. REYNOLDS, G.A. WILLIAMS, G.K. HARGIS
Calcium regulating hormones during the menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. 47, 626-629 (1978)

209. PITTINGER, C., P.M. CHANG, W. FAULKNER
Serum ionized calcium; some factors influencing its level.
Southern Med. J. 64, 1211-1223 (1971)

210. PLANCK, M.
Über die Erregung von Elektrizität und Wärme in Elektrolyten.
Ann. d. Phys. u. Chem. 39, 161-186 (1890a)

211. PLANCK, M.
Über die Potentialdifferenz zwischen zwei verdünnten Lösungen binärer Elektrolyte.
Ann. d. Phys. u. Chem. 40, 561-576 (1890b)

212. PLANT, S.B., D.A. McCARRON
Effects of sample freezing on ion-selective electrode determinations of serum calcium.
Clin. Chem. 28, 1362-1363 (1982)

213. PRASAD, A.S., E.B. FLINK
Effect of carbon dioxide on concentration of calcium in an ultrafiltrate of serum obtained by centrifugation.
J. appl. Physiol. 10, 103-107 (1957)

214. PRASAD, A.S., B.E. FLINCK
The base binding property of the serum proteins with respect to calcium.
J. Lab. Clin. Med. 51, 345-350 (1958)

215. PRUDEN, E.L., P.L. CREASON, W.D. BLOCK
Limitations of gel filtration for serum unbound calcium and magnesium.
Clin. Chim. Acta 27, 19-28 (1970)

216. PUNGOR, E.
Ion-selective electrodes.
Akademia Kiado, Budapest (1973)

217. RAAFLAUB, J.
Über ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung des ionisierten Calciums.
Z. Physiol. Chem. 288, 228-236 (1951)

218. RAAFLAUB, J.
Zur photometrischen Bestimmung des ionisierten Calciums in biologischen Flüssigkeiten, insbesondere im Harn.
Z. Physiol. Chem. 328, 198-206 (1962)

219. RADDE, I.C., B. HÖFKEN, D.K. PARKINSON, J. SHEEPERS, A. LUCKHAM
Practical aspects of a measurement technique for calcium ion activity in plasma.
Clin. Chem. 17, 1002-1006 (1971)

220. RAMAN, A.
Determination of ionized calcium in serum with a calcium electrode.
Biochem. Med. 3, 369-375 (1970)

221. RASMUSSEN, H., D.B.P. GOODMAN
Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation.
Physiol. Rev. 57, 421-509 (1977)

222. RAWSON, A.J., F.W. SUNDERMAN
Studies in serum electrolytes. XV. The calcium-binding property of the serum proteins (multiple myeloma, lymphogranuloma venereum and sarcoidosis.
J. clin. Invest. 27, 82-90 (1948)

223. RENOE, B.W., J.M. McDONALD, J.H. LADENSON
Influence of posture on free calcium and related variables.
Clin. Chem. 25, 1766-1769 (1979)

224. RENOE, B.W., J.M. McDONALD, J.H. LADENSON
The effects of stasis with and without exercise on free calcium various cations and related parameters.
Clin. Chim. Acta 103, 91-100 (1980)

225. RIETHMÜLLER, H., A. BRETSCHNEIDER
Zur Fehlerbreite der flammenphotometrischen Calciumbestimmung im menschlichen Serum (und Urin).
Z. Physiol. Chem. 293, 49-62 (1953)

226. RINGER, S.
Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle.
J. Physiol. (London) 3, 380-391 (1882)

227. RINGER, S.
A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart.
J. Physiol. (London) 4, 29-42 (1883)

228. RINGER, S., W. MURRELL
Concerning the effects on frogs of arrest of the circulation, and an explanation of the action of potash salts on the animal body.
J. Physiol. (London) 1, (1878)

229. ROBERTSON, W.C.
Measurement of ionized calcium in biological fluids.
Clin. Chim. Acta 24, 149-157 (1969)

230. ROBERTSON, W.G., M. PEACOCK
New techniques for the separation and measurement of the calcium fractions of normal human serum.
Clin. Chim. Acta 20, 315-326 (1968)

231. RONA, P., D. TAKAHASHI
Über das Verhalten des Calciums im Serum und über den Gehalt der Blutkörperchen an Calcium.
Biochem. Z. 31, 336-339 (1911)

232. RONA, P., D. TAKAHASHI
Beitrag zur Frage nach dem Verhalten des Calciums im Serum.
Biochem. Z. 49, 370-380 (1913)

233. ROSE, G.A.
Determination of the ionized and ultrafiltrable calcium of normal human plasma.
Clin. Chim. Acta 2, 227-236 (1957)

234. ROSE, G.A.
A simple and rapid method for the measurement of plasma ultrafiltrable and ionized calcium.
Clin. Chim. Acta 37, 343-352 (1972)

235. ROSS, J.W.
Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger.
Science 156, 1378-1379 (1967)

236. RUZICKA, J., E.H. HANSEN, J.C. TJELL
Selectrode - the universal ion-selective electrode. Part IV. The calcium (II) Selectrode employing a new ion exchanger in a nonporous membrane and a solid-state reference system.
Anal. Chim. Acta 67, 155-178 (1973)

237. RYAN, G.D., J.R.L. MASAREI
Validity of "corrected" calcium values.
Clin. Chim. Acta 91, 329-335 (1979)

238. RYCKEWAERT, A., G. RICHET, G. LEMAIE, M.C. BEGUE, J.P. FENELON
Etude de la calcémie dans une population de 3148 femmes. Variation avec l'age. Correlations avec d'autres valeurs biologique.
Rev. Rhum. Mal. Osteo-Articulaires 42, 461-469 (1975)

239. SACHS, C.E., A.M. BOURDEAU
Role of a dilaysable factor in calcium albumin binding.
Rev. Eur. Etudes Clin. Biol. 17, 218-220 (1972)

240. SACHS, C.E., A.M. BOURDEAU, S. BALSAM
Détermination du calcium ionisé dans le sérum avec une électrode spécifique a membrane liquide.
Ann. Biol. Clin. 27, 487-510 (1969)

241. SALTZMAN, H.A., A. HEYMAN, H.O. SIEKER
Correlation of clinical and physiologic manifestations of sustained hyperventilation.
N. Engl. J. Med. 268, 1431-1433 (1963)

242. SANDHU, R.S., S.J. FISCHMAN
Ionized calcium: Comparison of the results by three instruments.
Clin. Chem. 28, 1576-1577 (1982)

243. SCHAER, H.
Effect on ionized calcium of a correction of acidosis with alkalinizing agents.
Br. J. Anaesth. 48, 327-332 (1976)

244. SCHAER, H., U. BACHMANN
Ionized calcium in acidosis: Differential effect of hypercapnic and lactic acidosis.
Br. J. Anaesth. 46, 842-848 (1974)

245. SCHEIDEGGER, D., L.J. DROP, J.C. SCHELLENBERG
Role of the systemic vasculature in the hemodynamic response to changes in plasma ionized calcium.
Arch. Surg. 115, 206-211 (1980)

246. SHICHA, H., H.J. KLEIN, K. KASPAREK, F. RITZL
Aktivierungsanalytische quantitative Bestimmung mehrerer Elemente in verschiedenen Organen und im Karzinomgewebe.
Beitr. path. Anat. 138, 245-271 (1969)

247. SCHULTZ, F.A., A.J. PETRSEN, C.A. MASK, R.P. BUCK
Solid ion-exchange electrode selective for calcium ion.
Science 162, 267-268 (1968)

248. SCHWARTZ, H.D.
Serum ionized calcium by electrodes: new technology and methodology.
Clin. Chim. Acta 64, 227-239 (1975)

249. SCHWARTZ, H.D., B.C. McCONVILLE, E.F. CHRISTOPHERSON
Serum ionized calcium by specific ion electrode.
Clin. Acta 31, 97-107 (1971)

250. SCOTT, B.J., A.R. BRADWELL
Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nicel, and calcium.
Clin. Chem. 29, 629-633 (1983)

251. SEAMONDS, B., J. TOWFIGHT, D.A. ARVAN
Determination of ionized calcium in serum by use of an ionselective electrode. I. Determination of normal values under physiologic conditions, with comments on the effects of food ingestion and hyperventilation.
Clin. Chem. 18, 155-160 (1972)

252. SEVERINGHAUS, J.W., M. STUPFEL, A.F. BRADLEY
Accuracy of blood pH and pCO_2 determinations.
J. appl. Physiol. 9, 189-197 (1956)

253. SHEMERDIAK, W.P., S.C. KUKREJA, T.E. LAD, P.A.J. YORK, W.J. HENDERSON
Evaluation of routine ionized calcium determination in cancer patients.
Clin. Chem. 27, 1621-1622 (1981)

254. SHERWOOD, L.M., J.T. POTTS, A.D. CARE, G.P. MAYER; C.D. AURBACH
Evaluation of radioimmunoassay of factors controlling the secretion of parathyroid hormone.
Nature (London) 209, 52-54 (1966)

255. SIGGAARD-ANDERSON, O.
Factors affecting the liquid-junction potential in electrometric blood pH measurement.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 13, 205-211 (1961)

256. SIGGAARD-ANDERSEN, O.
The acid-base status of the blood.
Munksgaard, Copenhagen, fourth edition (1976)

257. SIGGAARD-ANDERSEN, O., N. FOGH-ANDERSEN, J. THODE
Elimination of the erythrocyte effect on the liquid junction potential in potentiometric measurements on whole blood using mixed salt bridge solutions.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 43-46 (1983a)

258. SIGGAARD-ANDERSEN, O., J. THODE, N. FOGH-ANDERSEN
What is "ionized calcium"?
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 11-16 (1983b)

259. SIGGAARD-ANDERSEN, O., J. THODE, N. FOGH-ANDERSEN
Nomograms for calculating the concentration of ionized calcium of human blood plasma from total calcium, total protein and/or albumin, and pH.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 57-63 (1983c)

260. SIGGAARD-ANDERSEN, O., J. THODE, J. WANDRUP
The concentration of free calcium ions in the blood plasma, "ionized calcium".
IFCC, EPpH Workshop, Copenhagen (1980)
In: SIGGAARD-ANDERSEN, O.: Blood pH, carbon dioxide, oxygen, and calciumionen. Private press, Copenhagen 163-190 (1981)

261. SINHA, T.K., S. MILLER, J. FLEMMING, R. KHARIRI, J. EDMONDSON, C.C. JOHNSTON, N.H. BELL
Demonstration of diurnal variation in serum parathyroid hormone in primary and secondary hyperthyroidism.
J. Endocrinol. Metab. 41, 1009-1016 (1975)

262. SMITH, S.C.H., B.M. BUCKLEY, G. WEDGE, A.M. BOLD
An evaluation of the ICA1 ionized calcium analyzer in a clinical chemistry laboratory.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 33-37 (1983)

263. SORELL, M., J.F. ROSEN
Ionized calcium: serum levels during symptomatic hypocalcemia.
J. Pediatr. 87, 67-70 (1975)

264. SOULIER, J.P., J.C. ROSNIER
Nouvelle méthode de dosage du calcium ionisé utilisant systéme coagulant: technique, resultats.
Presse méd. 66, 617-619 (1958)

265. STEICHEN, J.J., R.C. TSANG; T.L. GRATTON, A. HAMSTRA, H.F. DeLUCA
Vitamin D homeostasis in the perinatal period. 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal, cord and neonatal blood.
N. Engl. J. Med. 302, 315-317 (1980)

266. STEIN, F., J. KOLANOWSKI, S. BEMELMANS, P. DESMECHT
Renal handling of calcium in fasting subjects: Relation to ketosis and plasma ionized calcium level.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 99-100 (1983)

267. STOKER, D.J., V. WYNN
Effect of posture on the plasma cholesterol level.
Br. Med. J. 1, 336-338 (1966)

268. STOLZE, G., J. DEPERSDORF, H. FRIEDMANN, H.D. SCHMUDLACH, I. LINDEN
Die Wertung klinisch-chemischer Parameter bei körperlich Aktiven und nach intensiver Belastung.
Dtsch. Gesundh.-Wesen 33, 734-741 (1978)

269. STULZ, P.M., D. SCHEIDEGGER, L.J. DROP
Ventricular pump performance during hypocalcemia.
J. thorac. Cardiovasc. Surg. 78, 185-194 (1980)

270. STUDER, O., M. KNOB, U. BINSWANGER
Kalziumkonzentration im Serum.
Schweiz. med. Wschr. 102, 305-309 (1972)

271. SUBRYAN, W.L., M.M. POPOVTZER, S.D. PARKS, E.B. REEVE
Measurement of serum calcium with the ion-exchange electrode.
Clin. Chem. 18, 1459-1462 (1972)

272. TAN, C.M., A. RAMAN, T.A. SINNATHYRAY
Serum ionic calcium levels during pregnancy.
J. Obstet. Gynaecol. Br. Cwlth. 79, 694-697 (1972)

273. THODE, J., N. FOGH-ANDERSEN, P.D. WIMBERLEY, A. MØLLER, R. SØRENSEN, O. SIGGAARD-ANDERSEN
Relation between pH and ionized calcium in vitro and in vivo in man.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 79-82 (1983)

274. THODE, J., J. WANDRUP, F. AAS, O. SIGGAARD-ANDERSEN
Evaluation of a new semiautomatic electrode system for simultaneous measurement of ionized calcium and pH.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 42, 407-415 (1982)

275. TØRRING, O., H.E. SJÖBERG
An ionized calcium regulated calcium clamp technique in man.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 101-104 (1983)

276. TOFFALETTI, J., H.J. GITTELMAN, J. SAVORY
Separation and quantitation of serum constituents associated with calcium by gel filtration.
Clin. Chem. 22, 1968-1972 (1976)

277. TOFFALETTI, J., J. SAVORY, H.J. GITTELMAN
Use of gel filtration to examine the distribution of calcium among serum proteins.
Clin. Chem. 23, 2306-2310 (1977)

278. TOFFALETTI, J., G.N. BOWERS
Improvements in and clinical utility of a continuous-low method for routine measurement of dialyzable (ultrafiltrable) calcium.
Clin. Chem. 25, 1939-1943 (1979)

279. TOFFALETTI, J., D. TOMPKINS; G. HOFF
The Worthington "Ultrafree" device evaluated for determination of ultrafiltrable calcium in serum.
Clin. Chem. 27, 466-468 (1981)

280. TORIBARA, T.Y., A.R. TERPKA, P.A. DEWEY
The ultrafiltrable calcium of human serum.
I. Ultrafiltration methods and normal values.
J. clin. Invest. 36, 738-747 (1957)

281. TSANG, R., L. ABRAMS, T.H. JOYCE, C.R. BUNCHER; J.J. STEICHEN
Ionized calcium in neonates in relation to gestational age.
J. Pediatr. 94, 126-131 (1979)

282. VADGAMA, P., J. MITCHISON, A.K. COVINGTON, K.G. ALBERTI
Interferent ion effects on the Orion SS-20 calcium analyzer.
Clin. Chim. Acta 119, 250-256 (1982)

283. VALBERG, L.S., J.M. HOLT, J. SZIVEK
Determination of calcium, magnesium, copper, and zinc in red blood cells by emission spectrometry.
Anal. Chem. 36, 790-792 (1964)

284. VOGEL, H., M. KRÜGER-FRANKE, H.G. LÜHR, N. FRANKE; U. FINSTERER, A. WELZ
Total and ionized calcium levels during open heart surgery with two differenz pump priming solutions.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 111-114 (1983)

285. WALSER, M.
Ion association. VI. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma.
J. clin. Invest. 40, 723-730 (1961)

286. WANDRUP, J., C. KANCIR
The concentration of free calcium ions in whole blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 47-48 (1983)

287. WEEKE, E., Th. FRIES
Serum fractions of calcium and phosphorus in uraemia.
Acta med. Scand. 189, 79-85 (1971)

288. WEISTER, M.J., S.H. WHITLA, R. GOLGSMITH
Evidence for multiple calcium pools in the blood of dogs.
Nature (London) 197, 1170-1170 (1963)

289. WHITSETT, J., R.C. TSANG
In vitro effects of fatty acids on serum ionized calcium.
J. Pediatr. 91, 233-236 (1977)

290. WILKINSON, R.H.
A micromethod for serum calcium and serum magnesium.
J. clin. Pathol. 10, 126-135 (1957)

291. WILLIAMS, R.J.P.
The biochemistry of sodium, potassium, magnesium and calcium.
Chem. Soc. Quart. Rev. 24, 331-365 (1970)

292. WILLIAMS, G.Z., D.S. YOUNG, M.R. STEIN, E. COTLOVE
Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. I. Objectives, subject selection, laboratory procedures, and estimation of analytic deviation.
Clin. Chem. 16, 1016-1021 (1970)

293. WILLIS; J.B.
The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopie. I: Calcium.
Spectrochim. Acta 16, 259-272 (1960)

294. WILLS, M.R.
The effect of diurnal variation on total plasma calcium concentration in normal subjects.
J. clin. Pathol. 23, 772-777 (1970)

295. WILLS, M.R., M.R. LEWIN
Plasma calcium fractions and protein-binding of calcium in normal subjects and in patients with hypercalcaemia and hypocalcaemia.
J. clin. Pathol. 24, 856-866 (1971)

296. WISKE, P.S., S. EPSTEIN, N.H. BELL, S.F. QUEENER, J. EDMONDSON, C.C. JOHNSTON jr.
Increases in immunoreactive parathyroid hormone with age.
N. Engl. J. Med. 300, 1419-1421 (1979)

297. WORTSMAN, J., P. FRANCISKOVICH, R. TRAYCOFF; L.E. MAROUN
The distribution of protein-bound calcium in normal human serum: A tightly bound subfraction characterized. In: Calcium-binding proteins and calcium function.
Ed. WASSERMAN R.H. et al., North-Holland-New York 434-436 (1977)

298. WORTSMAN, J., L.I. KILLAM, R.B. TRAYCOFF
A rapid method for the determination of ultrafiltrable calcium in serum.
J. Lab. Clin. Med. 98, 691-696 (1981)

299. WORTSMAN, J., R.B. TRAYCOFF
Biological activity of protein-bound calcium in serum.
Amer. J. Physiol. 238, E 104-107 (1980)

300. WYBENGA, D.R., D.C. RANNON, F.A. IBBOTT
Factor for correcting ionized calcium values obtained from serum collected and stored without special precautions.
Paper No. 162, AACC Meeting, Cincinetti, Ohio (1972)

301. YENDT, E.R., T.B. CONNOR, J.E. HOWARD
In vitro calcification of rachitic rat cartilage in normal and pathological sera, with some observations on the pathogenesis.
Bull. John Hopkins Hosp. 96, 1-19 (1955)

302. ZEISLER, E.B.
Determination of diffusible serum calcium.
Amer. J. clin. Pathol. 24, 588-593 (1954)

303. ZETTNER, A., D. SELIGSON
Applikation of atomic absorption spectrophotometry in the determination of calcium in serum.
Clin. Chem. 10, 869-890 (1964)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Horn für die großzügig gewährte wohlwollende Beratung bei der Durchführung und Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Jahrmärker, Herrn Prof. K. Theisen und den Mitarbeitern der Abteilung für Kardiologie in der Medizinischen Klinik Innenstadt danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate und Herrn Prof. Dr. U. Lösch für die Durchsicht der Dissertation.

Der Medizinischen Klinik Innenstadt und dem Physiologischen Institut danke ich für die Bereitstellung und Schaffung der Arbeitsbedingungen.

LEBENSLAUF

Am 28. Juni 1942 wurde ich als Sohn des Landwirts Oswald Kölling und dessen Ehefrau Gertrud in Wüstermarke/N/L geboren.

Nach 12jähriger Schulzeit legte ich im Jahre 1960 am Gymnasium Luckau N/L die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1962, nach Ableistung meines Wehrdienstes, begann ich mit dem Studium der Tiermedizin als Austauschstudent an der Tierärztlichen Fakultät Sofia/Bulgarien. Dort legte ich im Jahre 1967 das Staatsexamen ab und war anschließend als Habilaspirant an der Tierärztlichen Fakultät Sofia bis 1971 tätig.

1969 promovierte ich an der Biowissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.

1972 bis 1983 war ich wissenschaftlicher Assistent und Angestellter am Institut für Ernähungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät und am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Im Sommersemester 1976 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität München und legte im November 1980 das dritte Staatsexamen ab. Nach meiner Approbation war ich von 1981 bis 1983 ärztlich an der Medizinischen Klinik Innenstadt tätig.

Zur Zeit bin ich Assistenz-Arzt am Deutschen Herzzentrum München.